

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ABATE DE CORVINA (*Argyrosomus regius*): QUAL O MÉTODO QUE MINIMIZA O STRESS E  
MAXIMIZA A QUALIDADE?

ANA MARGARIDA MAURÍCIO SECO

ORIENTADORA:

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

COORIENTADOR:

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ABATE DE CORVINA (*Argyrosomus regius*): QUAL O MÉTODO QUE MINIMIZA O STRESS E  
MAXIMIZA A QUALIDADE?

ANA MARGARIDA MAURÍCIO SECO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

VOGAIS:

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

ORIENTADORA:

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

COORIENTADOR:

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

2019

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Margarida Maurício Seco

Título da Tese ou  
Dissertação: Abate de corvina (*Argyrossomus regius*): qual o método que minimiza o stress e maximiza a qualidade?

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas: 2019

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☒ Produção Animal e Segurança Alimentar  
☐ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 4 de Dezembro de 2019

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

Ao meu super-herói, o meu irmão.

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer ao Professor Doutor Fernando Afonso, por ter despertado em mim o interesse e curiosidade pelo mundo da aquacultura, e por ter aceite ser o meu coorientador, da Faculdade de Medicina Veterinária. Obrigada pela ajuda em obter o estágio e pela disponibilidade, motivação e preocupação demonstrada.

À Professora Doutora Maria Gabriela Veloso, por toda a disponibilidade e dedicação em ajudar os seus alunos, um sincero obrigada.

À Doutora Narcisa Bandarra, chefe da divisão de valorização da aquacultura do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), em ter demonstrado disponibilidade para a orientação deste trabalho e por me ter criado a possibilidade da realização de ensaios na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Obrigada pelas palavras e pelo apoio no contorno dos percalços que surgiram, por acreditar em mim, e na realização deste trabalho.

Ao Doutor Pedro Pousão, pela disponibilidade da realização deste estudo na EPPO. Pelo apoio e preocupação demonstrados na resolução de problemas técnicos inerentes aos ensaios.

Ao Hugo Ferreira, pelos conhecimentos transmitidos e esclarecimento de dúvidas, pela cooperação na realização dos ensaios, sempre com muita simpatia.

Ao Márcio Moreira, por toda a disponibilidade em ensinar, corrigir, motivar, assim como em ajudar a arranjar soluções para superar as adversidades que surgiram. À Margarida, pela estadia, pelas boleias e pela ajuda no registo das medições, um sincero obrigada. À querida Conceição, do laboratório da EPPO, por toda a atenção e prontidão a ajudar na parte laboratorial do trabalho. Ao Sr. Nuno, e aos estagiários Gabriel e Alexandra, sempre disponíveis para ajudar, obrigada pela troca de conhecimentos e por toda a simpatia. Uma obrigada a toda a equipa da EPPO, pela receção, pelo apoio e cooperação na parte prática do trabalho.

A realização deste trabalho, assim como o término desta etapa, também não teria sido possível sem o contributo de um grupo de pessoas. Só me resta agradecer:

Ao Luís Lima, o meu porto de abrigo. Obrigada por estares sempre presente, por me acalmares sempre que preciso, por me levatares sempre que caio, obrigada simplesmente por existires. Agradeço também a toda a sua família, que agora também é minha. Um sincero obrigada aos pais e avós do Luís, por toda a preocupação e carinho ao longo deste percurso.

A todos os meus amigos e colegas de curso, por me terem acompanhado nesta vida académica, e por terem contribuído, de forma direta ou indireta, na escrita desta dissertação. Obrigada à Mafalda Lopes, pela amizade bonita e sincera que partilhamos, pelo

companheirismo, e pelos sonhos que idealizamos. Obrigada Carla e Madalena, por todo o apoio, incentivo e carinho.

E como não poderia faltar, um agradecimento do tamanho do mundo a toda a minha família. Às minhas queridas avós, por toda a ternura e carinho. Aos meus pais, por nunca me ter faltado nada, por me terem proporcionado a melhor educação que podiam, em especial à minha querida mãe, por demonstrar cada vez mais a mulher guerreira que é. Ao meu irmão, obrigada pelo apoio, por estares presente quando preciso, por seres o exemplo que quero seguir, e sobretudo por acreditares em mim. Obrigada por lutarem sempre do meu lado, por me demonstrarem que, apesar das reviravoltas que a vida dá, somos nós que a comandamos.

Agora a ti, avô. Agradecer-te nunca será suficiente. Guardo com todo o carinho a infância que me proporcionaste e, sobretudo, esta partilha da paixão pelo mundo animal. Onde quer que estejas, espero que estejas orgulhoso de mim. Serás sempre a minha melhor memória.

Abate de corvina (*Argyrosomus regius*): qual o método que minimiza o stress e maximiza a qualidade?

### Resumo

A etapa do abate é um dos pontos críticos na gestão da piscicultura, ao induzir stress nos peixes, o que não só afeta o bem-estar animal, como também a qualidade do produto final. No decorrer das investigações relativas à neuroanatomia e neurofisiologia dos peixes, é cada vez mais aceite que, tal como os mamíferos e aves, os peixes também são animais sencientes. Contudo, não são abrangidos pelo regulamento relativo à proteção dos animais no abate. Como tal, a etapa do abate de peixes acaba por ser negligenciada, ao ter pouca ou nenhuma consideração pelo bem-estar animal.

O principal objetivo desta dissertação é dar uma visão integrada dos efeitos de diferentes métodos de atordoamento e abate na corvina (*Argyrosomus regius*), um peixe teleósteo da família *Sciaenidae*, com crescente utilização na aquacultura. Os métodos estudados foram asfixia por exposição ao ar, termonarcose, eletronarcose, secção medular e *iki jime*. Foi avaliada a influência destes métodos nas componentes bem-estar animal e qualidade. No que se refere ao bem-estar animal, procedeu-se à avaliação da insensibilização e da resposta fisiológica ao stress, quanto à qualidade foi avaliada a evolução do músculo *post mortem* (*rigor mortis*) em associação com a avaliação sensorial do grau frescura. Os resultados revelaram que, o método japonês *iki jime* foi o único a induzir insensibilização imediata que, por sua vez, apresentou a resposta ao stress mais discreta e melhores resultados em termos de qualidade. Também foi possível apoiar a tese de que a asfixia por exposição ao ar não é uma prática ética, ao induzir uma resposta ao stress grave, o que demonstrou afetar de forma negativa a qualidade, ao acelerar o desenvolvimento do *rigor mortis* e, por sua vez, a deterioração do músculo.

Como complementaridade ao estudo anterior, foi realizado um inquérito por questionário, com o objetivo de avaliar a perceção do consumidor sobre o abate de peixes. Os resultados revelaram que, existe um forte desconhecimento acerca deste domínio, sobretudo no que se refere aos métodos de atordoamento e abate alternativos ao método praticado na pesca tradicional (asfixia por exposição ao ar). Contudo, os resultados revelaram também que, o método de abate a que o peixe for submetido pode influenciar a atitude do cidadão enquanto consumidor, o que pode representar um impacto no mercado. O reforço desta preocupação com o bem-estar dos peixes no abate, para além de promover a adoção de práticas mais éticas, também contribui para melhorar a qualidade, e assim, satisfazer as necessidades das características intrínseca e extrínsecas do produto, exigidas por parte do consumidor.

**Palavras chave:** *Argyrosomus regius*; métodos de atordoamento e abate; *iki jime*; stress; *rigor mortis*.



Slaughter of meagre (*Argyrosomus regius*): what is the method that minimizes stress and maximizes quality?

### **Abstract**

The slaughter is one of the important steps in fish farming management, it causes stress on animals and consequently reduces animal welfare as well as the quality of the product. In the course of investigations into the neuroanatomy and neurophysiology of fish, it is becoming more accepted, that like mammals and birds, fish are also sentient animals. However, they are not embraced by animal rights regulations. Therefore, the stage of fish slaughter ends up being neglected, with no consideration for the animal welfare.

The main objective of this dissertation is to provide an evaluation of the effects of different stunning and slaughter methods in meagre (*Argyrosomus regius*), a teleost fish of the *Sciaenidae* family, with increasing exploration in aquaculture. The methods studied were: asphyxiation by air exposure, thermonarcosis, electronarcosis, medullary section and *iki jime*. The influence of these methods on animal welfare and quality components was evaluated. With regard to animal welfare, the sensitization and physiological response to stress were evaluated. The quality of the post mortem muscle (*rigor mortis*) evolution was evaluated in association with the sensory evaluation of the freshness degree. The results showed that the Japanese, *iki jime*, method was the only one that induced immediate insensitivity, which in turn had a lower stress response and better quality. It was also possible to conclude that asphyxiation by air exposure is not an ethic practice, causing high levels of stress, which negatively affects meat quality by accelerating the process of fish deterioration.

As a complement to the previous study, a survey was conducted to assess fish slaughter awareness by fish consumers. The results revealed that fish slaughter is still a fairly unknown subject, especially regarding the alternative methods to the traditional method (asphyxiation by air exposure). However, it revealed that consumers preference can be influenced, when they are aware of the different slaughter methods, which can have an impact on the market.

Using slaughter methods that take animal welfare in account, will not only reduce the animal stress but also improve fish quality, and thus meeting the needs of the intrinsic and extrinsic characteristics of the product by the consumer.

**Key words:** *Argyrosomus regius*; stunning and slaughter methods; fish; stress; *rigor mortis*.

## Índice geral

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de gráficos .....	ix
Lista de tabelas .....	x
Lista de abreviaturas e símbolos .....	xii
Descrição das atividades desenvolvidas .....	1
Introdução e objetivos .....	3
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
<b>1. Introdução</b> .....	4
<b>2. Nocicepção em peixes</b> .....	5
2.1. Nociceptores .....	6
2.2. Medula espinhal e vias espinhais .....	7
2.3. Neurotransmissores .....	8
2.4. Estruturas encefálicas .....	8
2.4.1. Telencéfalo .....	9
2.4.2. Pálio .....	10
2.5. Substâncias opioides endógenas e recetores .....	10
<b>3. Resposta ao stress em peixes</b> .....	12
3.1. Resposta primária ao stress .....	13
3.2. Resposta secundária ao stress .....	14
3.3. Resposta terciária ao stress .....	15
<b>4. Efeito do stress inerente ao abate na qualidade do peixe</b> .....	15
4.1. Evolução do músculo <i>post mortem</i> .....	16
4.1.1. Pré-rigor .....	17
4.1.2. <i>Rigor mortis</i> .....	18
4.1.3. Pós-rigor .....	18
4.2. Influência do stress no desenvolvimento do <i>rigor mortis</i> .....	18
4.3. Importância tecnológica do <i>rigor mortis</i> .....	19
<b>5. Métodos de atordoamento e abate de peixes</b> .....	20
5.1. Asfixia .....	21
5.1.1. Asfixia por exposição ao ar .....	21
5.1.2. Asfixia em água à temperatura ambiente .....	22

5.1.3. Asfixia em água gelada/pasta de gelo .....	22
5.2. Métodos mecânicos .....	24
5.2.1. Percussão craniana .....	24
5.2.2. <i>Iki jime</i> .....	24
5.2.3. Tiro .....	25
5.2.4. Decapitação/ luxação cervical / secção medular .....	26
5.2.5. Sangria sem insensibilização prévia .....	26
5.3. Outros métodos.....	27
5.3.1. Eletronarcose/ eletrocussão .....	27
5.3.2. Narcose por dióxido de carbono.....	28
5.3.3. Sedação com anestésico.....	29
<b>6. Abate de peixes na Europa</b> .....	30
6.1. Normas da OIE relativas ao abate de peixes.....	30
6.2. Panorâmica geral do abate de peixes da EEE.....	30
<b>II – VISÃO INTEGRADA DOS EFEITOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE ATORDOAMENTO E ABATE NA CORVINA (<i>Argyrosomus regius</i>)</b> .....	32
<b>1. Introdução</b> .....	32
<b>2. Material e métodos</b> .....	33
2.1. Estação Piloto de Piscicultura de Olhão.....	33
2.2. Corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) .....	33
2.3. Captura.....	34
2.4. Métodos de atordoamento e abate.....	35
2.5. Bem-estar animal .....	38
2.5.1. Avaliação da insensibilização .....	38
2.5.2. Avaliação da resposta fisiológica ao stress .....	39
2.6. Qualidade do peixe .....	40
2.6.1. Avaliação da evolução do músculo <i>post mortem</i> .....	40
2.6.1.1. Estado de Rigor .....	40
2.6.1.2. Índice de Rigor .....	41
2.6.2. Avaliação sensorial do grau de frescura .....	41
2.7. Análise estatística dos dados .....	42
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	43
3.1. Bem-estar animal .....	43
3.1.1. Avaliação da insensibilização .....	43
3.1.2. Avaliação da resposta fisiológica ao stress .....	46
3.2. Qualidade do peixe .....	49

3.2.1. Avaliação da evolução do músculo <i>post mortem</i> .....	49
3.2.1.1. Estado de Rigor .....	50
3.2.2.2. Índice de Rigor .....	51
3.2.2. Avaliação sensorial do grau de frescura .....	54
<b>4. Conclusão</b> .....	55
<b>III – PERCEÇÃO DO CONSUMIDOR SOBRE O ABATE DE PEIXES</b> .....	57
<b>1. Introdução</b> .....	57
<b>2. Material e métodos</b> .....	57
2.1. Inquérito por questionário .....	57
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	58
3.1. Caracterização sociodemográfica .....	58
3.2. Caracterização dos hábitos de consumo .....	59
3.3. Avaliação da percepção do consumidor sobre ao abate de peixes .....	59
<b>4. Conclusão</b> .....	64
Considerações finais .....	65
Bibliografia .....	67
Anexos .....	76

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Diagrama do processo neurofisiológico da dor, nocicepção, em peixes .....	6
<b>Figura 2</b> - Posição dos nociceptores polimodais (triângulos), nociceptores mecanotérmicos (diamantes) e nociceptores mecanoquímicos (hexágonos) na cabeça e face da truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (fonte: Sneddon et al., 2003) .....	7
<b>Figura 3</b> – Anatomia do cérebro do peixe <i>versus</i> cérebro humano (Adaptado de: <a href="http://www.fishpain.com/fish-and-pain-brain-structures.htm">http://www.fishpain.com/fish-and-pain-brain-structures.htm</a> ) .....	9
<b>Figura 4</b> - Diagrama da resposta ao stress em peixes .....	13
<b>Figura 5</b> - Diagrama geral da resposta primária ao stress em peixes: alterações neuroendócrinas .....	14
<b>Figura 6</b> - Dispositivo para o abate de peixes através do método <i>Iki jime</i> (A) e respetivo dispositivo para contenção efetiva (B). Fonte: <a href="https://www.ikigun.com/">https://www.ikigun.com/</a> .....	25
<b>Figura 7</b> - Corvina, <i>Argyrosomus regius</i> . Fonte: <a href="http://www.ipma.pt">www.ipma.pt</a> .....	34
<b>Figura 8</b> - Tanques de terra da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), onde foram capturadas as corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) para o estudo dos efeitos de diferentes métodos atordoamento e abate (asfixia por exposição ao ar, termonarcose, eletronarcose, secção medular e <i>iki jime</i> ) .....	35

<b>Figura 9</b> – Abate de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) por exposição ao ar à temperatura ambiente (21°C) (A); abate de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) por imersão numa tina com água e gelo na proporção de 1:1 a 2-4°C (B).....	36
<b>Figura 10</b> - Equipamento para o abate de peixes por eletronarcose (A). O campo elétrico é gerado através de dois elétrodos de placa colocados nas paredes opostas da tina (B) .....	36
<b>Figura 11</b> – Local de incisão para o abate de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) por secção medular (A). Ponto de referência para o abate de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) pelo método <i>iki jime</i> (B). (imagem adaptada de: <a href="http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en">http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en</a> ).....	37
<b>Figura 12</b> - Colheita de sangue na corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) através da punção da veia caudal (A) e introdução em tubos “eppendorf” (B) para posterior avaliação das concentrações plasmáticas dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais) .....	39
<b>Figura 13</b> - Pesagem e medição do comprimento do corpo de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ), seguida de colocação em caixas de poliestireno cobertas com gelo (1:1).....	40
<b>Figura 14</b> - Diagrama da medida do comprimento da inclinação da cauda, para o cálculo do índice <i>rigor mortis</i> , onde $IR = 100 * (L0-Lt) / L0$ (Bito et al., 1983). .....	41
<b>Figura 15</b> - Dissecção de corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ). Localização do cérebro, dado como ponto de referência para o abate por <i>iki jime</i> .....	44
<b>Figura 16</b> - Corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) na tina de eletronarcose antes do campo elétrico ser gerado (A). Corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) na tina de eletronarcose imediatamente após o campo elétrico ter sido gerado (exposição total de 20s em corrente alternada (15; 5s) (B).....	48
<b>Figura 19</b> - Figura 16 - Peixe em estado pré-rigor (A). Peixe em pleno estado de <i>rigor mortis</i> (B) .....	51

## Lista de gráficos

<b>Gráfico 1</b> - Período de permanência do parâmetro comportamental natação, equilíbrio, movimento opercular e reflexo vestibulo-ocular, em corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ), imediatamente após o início da aplicação dos métodos de atordoamento e abate termionarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), <i>iki jime</i> (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Os resultados são expressos em segundos (n = 6 em cada grupo). São representados os mínimos, máximos e as medianas .....	43
<b>Gráfico 2</b> - Concentração plasmática de cortisol, glucose, lactato e proteínas totais, das amostras de sangue colhidas em corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ), após o abate com a aplicação dos métodos de atordoamento e abate termionarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), <i>iki jime</i> (grupo IJ), e asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Um grupo adicional,	

que foi colocado numa tina de 300L com 22,5mL com fenoxietanol (anestesiado), é dado como grupo controlo. Colunas com asteriscos apresentam diferenças significativas em relação ao grupo controlo ( $P < 0,05$ , pelo teste de Tukey). Os resultados são expressos, em ng/mL e mg/mL, como média e desvio padrão ( $n = 6$  em cada grupo). ..... 48

**Gráfico 3** - Curva de desenvolvimento do IR (índice de rigor) em corvinas (*Argyrosomus regius*) avaliada nos métodos de atordoamento e abate por termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Medições registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h). Os resultados são expressos em percentagem como média ( $n=6$  em cada grupo). Resultados com “\*\*”, não apresentam diferença significativa entre si ( $P > 0,05$ , pelo teste de Tukey) no último tempo de amostragem..... 53

**Gráfico 4** - Dinâmica da média das pontuações do Índice de Qualidade (IQ), em escala de 0 a 17 de corvinas (*Argyrosomus regius*), após os métodos de atordoamento e abate por termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF), armazenadas numa camara frigorifica (2-4°). Medições registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h) ..... 55

**Gráfico 5** - Distribuição da amostra para a questão “Na sua opinião, os peixes são seres dotados de sensibilidade?” de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem ..... 60

**Gráfico 6** - Distribuição da amostra para a questão: “Indique, o fator a ter em consideração no abate de peixes”, de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência e percentagem

**Gráfico 7** - Distribuição da amostra para a questão: “Na sua opinião, a etapa do abate influencia a qualidade do peixe?” de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem. .... 61

**Gráfico 8** - Distribuição da amostra para a questão “Indique os métodos de atordoamento e abate de peixes que conhece”, de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência ..... 61

**Gráfico 9** - Distribuição da amostra para a questão “Indique, na sua opinião, qual o método de abate de peixes que induz: mais/menos stress”, de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência..... 62

**Gráfico 10** - Distribuição da amostra para a questão “No momento de compra, o método de abate a que o peixe foi sujeito, pode influenciar sua decisão?” e para a questão “Sabe o que é um abate com ética?” de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem ..... 62

## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Resumo das semelhanças entre peixes e mamíferos, no processo neurofisiológico da dor, a nocicepção..... 11

**Tabela 2** - Exemplos de respostas comportamentais evocadas por peixes, quando sujeitos a estímulos ..... 12

<b>Tabela 3</b> - Período de tempo necessário para a insensibilização total ser alcançada por asfixia por exposição ao ar, em diferentes espécies de peixes. ....	21
<b>Tabela 4</b> - Período de tempo necessário para a insensibilização total ser alcançada por termonarcose/choque térmico/hipotermia, em diferentes espécies de peixes .....	23
<b>Tabela 5</b> - Período de tempo necessário para a insensibilização total ser alcançada por sangria sem insensibilização prévia, em diferentes espécies de peixes.....	27
<b>Tabela 6</b> - Período de tempo necessário para a insensibilização total ser alcançada por dióxido de carbono, em diferentes espécies de peixes. ....	29
<b>Tabela 7</b> - Métodos de atordoamento e abate utilizados nas principais espécies de peixes produzidas nos países da EEE (Adaptado de COM, 2018).....	31
<b>Tabela 8</b> - Classificação taxonómica da corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) (Chao 1986). ....	34
<b>Tabela 9</b> - Síntese dos métodos de atordoamento e abate da corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ), para posterior visão integrada dos seus efeitos.....	37
<b>Tabela 10</b> - Parâmetros comportamentais para a avaliação da insensibilização na corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ), após o início da aplicação de diferentes métodos de atordoamento e abate (asfixia por exposição ao ar, termonarcose, eletronnarcose, secção medular e <i>iki jime</i> ) .....	38
<b>Tabela 11</b> -Período de permanência do parâmetro comportamental natação, equilíbrio, movimento opercular e reflexo vestibulo-ocular em corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ), imediatamente após o início da aplicação dos métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), <i>iki jime</i> (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Os resultados são expressos em segundos, como médias e respetivo desvio padrão (n= 6 em cada grupo). O período de tempo necessário para a insensibilização total é expresso em minutos. ....	44
<b>Tabela 12</b> - Gestão do tipo de corrente (corrente contínua CC ou corrente alternada CA) e tempo de exposição para o abate de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) por eletronnarcose. ....	4
<b>Tabela 13</b> - Concentração plasmática dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais) de amostras de sangue colhidas em corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) imediatamente após o abate por diferentes métodos: termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), <i>iki jime</i> (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Um grupo adicional, colocado numa tina de 300L com 22,5mL com fenoxietanol, é dado como grupo controlo. Os resultados são expressos em ng/mL e mg/ml, como média e desvio padrão (n = 6 em cada grupo) .....	47
<b>Tabela 14</b> - Avaliação do estado de rigor de corvinas ( <i>Argyrosomus regius</i> ) após o abate pelos métodos: termonarcose (TN), secção medular (SM), <i>iki jime</i> (IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Avaliações registadas no decorrer de 52 horas <i>post mortem</i> (5, 22, 29, 46 e 52h). Aos	

peixes é atribuído um valor de 0 a 5, onde o limite mínimo corresponde à ausência de rigor, e o limite máximo corresponde a um estado de rigor muito forte (Curran et al. 1986) ..... 50

**Tabela 15** - Comprimento da inclinação da cauda e índice de rigor (calculado de acordo com Bito et al. 1983), de corvinas (*Argyrosomus regius*) registado após o abate por: termonarcose (TN), secção medular (SM), *iki jime* (IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Medições registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h). Os resultados do comprimento da inclinação da cauda são expressos em cm, com calibração de aproximação de 0,1 mm, como média e respetivo desvio padrão; e os do índice de rigor são expressos em percentagem, como média e respetivo desvio padrão (n=6 em cada grupo). Os resultados, seguidos de letras minúsculas, nas linhas, não apresentam diferenças significativas (P>0,05, teste de Tukey) entre os diferentes grupos, no mesmo tempo de amostragem, no decorrer de 52h *post mortem* ..... 51

## Lista de abreviaturas e símbolos

% – Por cento

~ – Aproximadamente

± – Mais ou menos

ACTH – Adrenocorticotropic Hormone (Hormona Adrenocorticotrófica)

AF – Asfixia por exposição ao ar

α-MSH – α-Melanocyte-stimulating Hormone (Hormona Estimulante de α-Melanócito)

AN – Anestesia

AVMA - American Veterinary Medical Association (Associação Americana de Medicina Veterinária)

cm – Centímetros

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CRH - Corticotropin-releasing Hormone (Hormona Libertadora de Corticotropina)

EFSA - European Food Safety Authority (Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos)

EL – Eletronarcose

FAO – Food and Agriculture Organization (Organização de Alimentos e Agricultura)

FAWC – Farm Animal Welfare Council (Conselho de Bem-estar de Animais de Produção)

g – Grama

GR – Glucocorticoid Receptor (Recetores de Glucocorticóides)

HPI – Hypothalamic-Pituitary-Interrenal (Hipotálamo-Hipofise-Interrenal)

HSA – Humane Slaughter Association (Associação de Abates Humanitários)

IJ – *Iki Jime*

IR – Índice de Rigor

IQ – Índice de Qualidade



l – Litros  
nm – Nanómetros  
m – Metros  
mg – Miligrama  
min – Minutos  
mL – Mililitros  
mm – Milímetros  
MR – Receptor Mineralocorticoide (Recetores de Mineralocorticóides)  
NFSA – Norwegian Food Safety Authority (Autoridade Norueguesa para a Segurança dos Alimentos)  
°C – Grau Celsius  
POMC – Pro-opiomelanocortin (Pró-opiomelano)  
QIM – Quality Index Method (Método do Índice de Qualidade)  
r.p.m – Rotações por minuto  
RSPCA – Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (Sociedade Real para a Prevenção da Crueldade contra Animais)  
s – Segundos  
SM – Secção medular  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNP – Sistema Nervoso Periférico  
TN – Termonarcose  
ug – Microgram



## **Descrição das atividades desenvolvidas**

O presente trabalho foi elaborado com base nas atividades desenvolvidos na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), no período de Março a Agosto do ano 2018. A dissertação foi realizada no âmbito da área de produção animal, sob a orientação da Doutora Narcisa Bandarra, chefe de divisão de Aquacultura e Valorização do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), e coorientação do Professor Doutor Fernando Afonso, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A EPPO caracteriza-se por ser uma infraestrutura única no país, concebida para a realização de investigação, desenvolvimento e demonstração experimental, com o objetivo de contribuir para o crescimento do setor produtivo. Dentro deste período foi possível acompanhar e participar em atividades de rotina diária, como a medição dos parâmetros de água, a reposição de alimento, a avaliação do estado geral dos animais e renovação da água. A medição dos parâmetros da água foi efetuada duas vezes por dia, para o registo da temperatura da água, percentagem de oxigénio, salinidade e pH, de forma a detetar eventuais alterações e corrigir assim que possível. É também necessária uma verificação constante da quantidade de alimento disponível nos alimentadores automáticos. O alimento é comum para todos os peixes, apenas o calibre do grão da ração é que varia consoante o tamanho do peixe, exceto na maternidade e nos juvenis, onde as necessidades nutricionais são mais exigentes e é necessária uma composição diferente da ração. Durante a alimentação é muito importante avaliar o estado geral dos animais, a fim de identificar eventuais patologias a nível individual ou coletivo. Quando num tanque os peixes apresentam alterações no apetite, na natação, no comportamento de cardume e se verifica a existência de animais mortos, ativa-se um estado de vigilância contínuo de forma a identificar a etiologia para solucionar o problema o mais rápido possível. Apesar de a renovação de água nos tanques ser contínua através de um sistema de bombagem, são necessárias grandes renovações de água, através da abertura e fecho manual das comportas (purgas), de forma a eliminar o excesso de microalgas e matérias tóxicas, aumentar os níveis de oxigénio, ou até como medida preventiva e terapêutica, caso se identifiquem alterações no comportamento dos peixes.

Assisti à recolha de ovos, cuja manipulação deve ser a mais cuidadosa possível de forma a não interferir na viabilidade dos mesmos. Através das difusoras de ar os ovos são encaminhados para um coletor com posterior passagem para baldes, para posterior pesagem e identificação da respetiva fase de desenvolvimento (avaliação à lupa) e para avaliação da relação diária da qualidade da postura. Para dar continuidade à linha de produção, os ovos foram colocados em incubadoras que são tanques com sistema de filtragem próprio, com condições especiais de temperatura da água, oxigenação e luminosidade. Após a eclosão é feita a transferência das larvas para os tanques larvares (1500L). A EPPO dispõe também de

8 tanques ovais no exterior com 18000L, a fim de acolher juvenis antes de serem libertados em tanques de terra para a fase de engorda, num regime de produção semi-intensivo. No total existem 17 tanques de terra, com as mesmas características, condições e equipamentos (sistemas de canalização, sistemas de comportas, redes “anti pássaros”, arejadores e alimentadores automático).

Para além das atividades rotineiras, foi possível participar noutras atividades, tais como: anestesia de peixes para amostragem biométrica, a fim de obter a análise evolutiva do tamanho, do peso e identificar possíveis patologias ou deformações que possam comprometer o bem-estar animal ou que impliquem o início de um tratamento coletivo. Para a amostragem biométrica, avaliam-se entre 50 a 100 exemplares, com recurso ao anestésico fenoxietanol, que é administrado através de um banho de imersão, de forma a ocorrer a dissolução e assim obter a concentração pretendida. Aquando de peixes imóveis à superfície do tanque é feita a recolha manual para um breve exame de estado geral do animal e identificação de qualquer alteração/deformação, assim como o registo de dados obtidos na pesagem e medição (ictiometro), para o cálculo do índice de condição. Durante a anestesia também se procede à marcação eletrónica dos peixes, com propósitos específicos como reprodução ou estudos científicos que exijam a identificação do animal. Participei na pesca, que é um procedimento vagaroso e delicado, de forma a evitar comprometer o bem-estar animal. Quando o peixe é destinado à doação é morto por termonarcese. Contudo, tive a oportunidade de aprender e participar em diferentes métodos, nesta etapa do ciclo de produção. Participei na recolha de sangue em peixes, onde aprendi e executei diferentes técnicas. Fiz a dissecação e a recolha de amostras de músculo e fígado, o que me permitiu aprofundar o conhecimento da anatomia dos peixes.

O estudo apresentado na dissertação, onde é dada uma visão integrada dos efeitos de diferentes métodos de atordoamento e abate de corvina (*Argyrosomus regius*), foi resultado de um projeto desenvolvido na EPPO. A investigação e as atividades desenvolvidas na EPPO são suportadas através de projetos no âmbito de programas de financiamento, a nível nacional e internacional. Existe uma colaboração com outros institutos de investigação e universidades, o que promove a permuta de conhecimento.

Este período permitiu-me adquirir não só conhecimentos sobre a produção aquícola em Portugal, como também foi importante na minha formação científica e técnica.

De notar que, o peixe produzido pôde ter como destino instituições de beneficência, uma vez que são respeitadas as regras de qualidade e segurança dos alimentos.

## Introdução e objetivos

O setor da aquacultura tem contribuído para satisfazer a crescente procura de proteína de boa qualidade. Apesar de Portugal apresentar condições favoráveis para produção aquícola, estabilizou e não acompanha o crescimento mundial deste setor, que é o setor de produção animal com maior crescimento a nível mundial. O Médico Veterinário tem como responsabilidade desenvolver e melhorar os sistemas de produção, ao ter em consideração as problemáticas da segurança dos alimentos, do bem-estar animal e da defesa do ambiente. É através da investigação que é possível alcançar progressos no setor de produção animal.

O presente estudo teve como propósito aprofundar o conhecimento relativo ao abate de peixes, mais concretamente sobre os métodos de atordoamento e abate, uma temática negligenciada em comparação com os outros setores de produção animal. O principal objetivo desta dissertação foi dar uma visão integrada do efeito de diferentes métodos de atordoamento e abate de corvina (*Argyrosomus regius*), quer na componente bem-estar animal, quer na componente qualidade, através da avaliação:

- Da insensibilização;
- Da resposta fisiológica ao stress;
- Da evolução do músculo *post mortem* (*rigor mortis*);
- Do grau de frescura (sensorial).

Para completar o estudo anterior e de forma a obter um parecer social, para além de um parecer científico, foi realizado um inquérito por questionário com o objetivo de avaliar a perceção do consumidor sobre a temática “o abate de peixes”.

# **I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. Introdução**

Os produtores cada vez mais se dedicam ao alcance da harmonia entre as características do produto e as exigências do consumidor, o que enfatiza o conceito de qualidade. A qualidade do produto, do ponto de vista do consumidor, não se restringe apenas às características intrínsecas, mas também às extrínsecas, isto é, preocupam-se também com aspetos relacionados com o ciclo de produção, como o bem-estar animal (Knowles et al. 2008). Existe uma grande controvérsia em relação à capacidade de os peixes sentirem dor, alguns autores não consideram os peixes como animais sencientes (Rose 2002), o que acaba por negligenciar o bem-estar destes animais no ciclo de produção. Contudo, há evidências anatómicas, fisiológicas e comportamentais que demonstram o contrário (Portavella et al. 2003). Tal como acontece com os outros vertebrados, os peixes respondem aos desafios ambientais com uma série de ajustes neuroendócrinos adaptativos, a qual se denomina de "resposta ao stress" (Braithwaite and Ebbesson 2014). Embora não esteja definido um critério único para medir o bem-estar animal, uma ampla gama de medições fisiológicas, bioquímicas e comportamentais é utilizada para avaliar os níveis de stress (Acerete et al. 2009; Knowles et al. 2008).

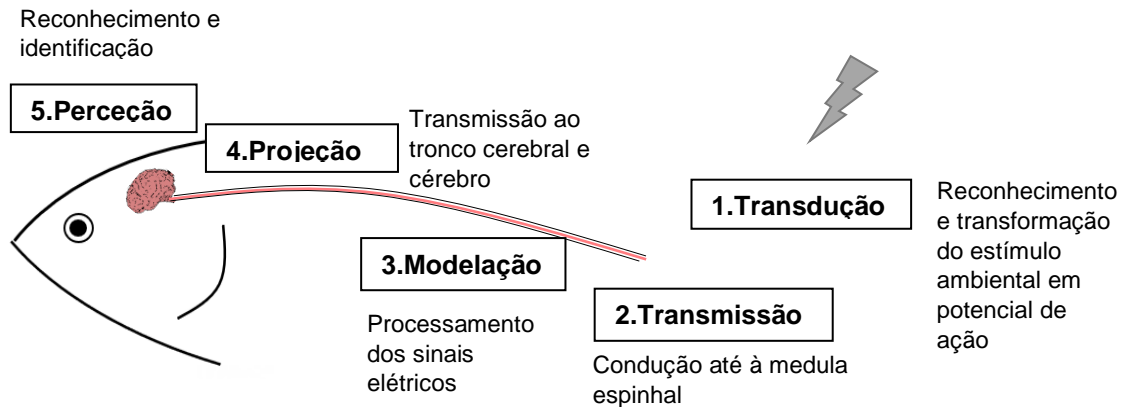
Um dos pontos mais críticos na gestão da piscicultura é a etapa do abate, que é particularmente propensa a induzir stress, e desta forma, a comprometer o bem-estar dos peixes (Ribas et al. 2007). Embora o abate de mamíferos e aves para consumo humano seja regulamentado por leis, decretadas em muitos países (Caporale et al. 2005), a maioria ainda não abrange os peixes (Robb et al. 2000a). Nesta etapa, deve-se priorizar o abate ético, que se baseia no princípio de que o animal deve ser morto rapidamente com o mínimo de medo, dor ou sofrimento (FAWC 1996). Não há nenhuma evidência de qual o melhor método a ser utilizado, contudo é certo que as formas stressantes de abate, para além de influenciarem o bem-estar animal, também influenciam a qualidade do peixe (Lambooy et al. 2006). Desta forma, além das considerações éticas, há também razões económicas para o uso de procedimentos éticos, já que a qualidade do peixe é afetada de forma negativa quando o bem-estar não é valorizado.

## 2. Nociceção em peixes

Para proporcionarmos um adequado bem-estar aos peixes que produzimos é necessário perceber como é que eles respondem a situações nocivas/desafios ambientais. O processo neurofisiológico da dor, também chamado de nociceção, é similar em todos os mamíferos, com variações individuais em cada espécie (Lemke 2004). No entanto, a nociceção em peixes não é tão valorizada, talvez por serem animais filogeneticamente mais afastados. Alguns autores defendem que a percepção da dor só é possível com a presença do neocórtex e que, por isso, apenas os mamíferos teriam essa capacidade (Rose et al. 2014). Entretanto, Segner (2012) afirmou que, a percepção da dor nos mamíferos não é exclusiva da atividade do neocórtex, mas envolve também regiões subcorticais e do tronco cerebral, e que estruturas homólogas são encontradas no encéfalo do peixe. Uma apreciação funcional de diferentes vertentes como anatomia e fisiologia, e o modo como estão relacionadas com a origem, transmissão e reconhecimento do estímulo doloroso, é essencial para entender melhor o processo de nociceção (Lamont et al. 2000; Gaynor and Muir 2008).

A dinâmica dos componentes do Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico (SNP) é responsável em grande parte pelo processo de dor. Um estímulo doloroso atinge o cérebro através do conjunto de 5 etapas: transdução, transmissão, projeção, percepção e modelação (Gaynor and Muir 2008) (figura 1). Quando de um estímulo ambiental, a porção terminal de uma fibra nervosa sensível reconhece e transforma (transdução) o estímulo em sinais elétricos, que são conduzidos (transmissão) até à medula espinhal (Gaynor and Muir 2008). Aqui são, imediatamente, processados (modelação) e transmitidos (projeção) ao tronco cerebral e cérebro, onde são reconhecidos e identificados (percepção) e, novamente, alterados (modelação secundária), e assim são produzidas respostas motoras apropriadas (Paul-Murphy 2007) (figura 1). Estas etapas só são possíveis devido à sequência de 3 neurónios: o de primeira ordem (neurónio aferente primário), o de segunda ordem (neurónio de projeção) e por último, o de terceira ordem (neurónio supraespinhal) (Paeile 2005).

De acordo com Bateson (1991), é possível determinarmos se um animal é capaz de sentir dor consoante critérios como: presença de nociceptores, presença de estruturas encefálicas e respetivas vias de condução, substâncias opióides endógenas e recetores, redução da resposta nociceptiva em resposta a analgésicos.



**Figura 1 – Diagrama do processo neurofisiológico da dor, nocicepção, em peixes.**

## **2.1. Nociceptores**

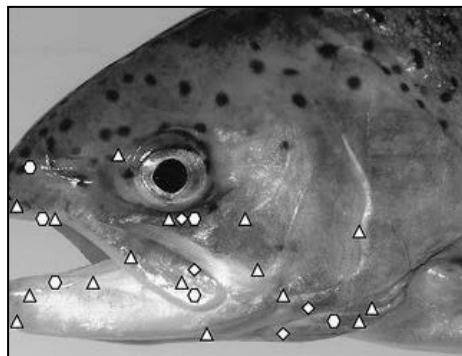
Os nociceptores são as terminações nervosas sensoriais periféricas, especializadas para sinalizar e codificar estímulos prejudiciais aos tecidos (Zieglgänsberger 1986). São os responsáveis pela transdução dos estímulos dolorosos (mecânicos, térmicos e químicos) em impulsos elétricos (potenciais de ação) (Lamont et al. 2000). A investigação com trutas arco-íris permitiu verificar que vários tipos de nociceptores estão presentes na pele e na córnea (figura 2), e que tal como nos mamíferos, diferentes recetores respondem a diversos tipos de danos nos tecidos (Sneddon et al. 2003). Posteriormente ao estímulo sensorial ser detetado, este é conduzido através dos nervos periféricos desde o recetor até à medula espinhal. Os nervos periféricos são constituídos por fibras nervosas mielinizadas do tipo A, e não mielinizadas do tipo B e C (Paeile 2005). Os nociceptores das fibras A são responsáveis pela dor aguda, primeira dor ou dor rápida (Lemke 2004), enquanto que, as fibras C são responsáveis pela segunda dor ou dor lenta (Lamont et al. 2000).

Estudos anatómicos e fisiológicos confirmaram a existência de fibras nociceptoras Aδ e C em peixes como a truta arco-íris (Chandroo et al. 2004). Estas fibras foram isoladas e descritas no nervo que enerva a cabeça (nervo trigémio) e nos nervos que enervam a barbatana caudal (Sneddon et al. 2003). Num outro estudo, estímulos destrutivos (pinçamento, perfuração, queimadura) resultaram em atividade eletrofisiológica dos gânglios do trigémio (Matthews and Wickelgren 1978), células dorsais, medula espinhal e cérebro (Martin and Wickelgren 1971; Rovainen and Yan 1985), o que confirma a existência de nociceptores. Os peixes ósseos têm um sistema nociceptivo muito semelhante ao dos mamíferos e aves. Além das espécies mais evoluídas, estudos anatómicos e fisiológicos de espécies de peixes primitivos como as lampreias (*Petromyzon marinus*, *Ichthyomyzon*



*unicuspid*) confirmaram a existência de fibras nervosas funcionais nociceptoras (Chandroo et al. 2004).

No entanto, algumas diferenças existem, por exemplo, ausência de nociceptores sensíveis ao frio em peixes (Ashley et al. 2006), e um número mais reduzido de fibras C (aproximadamente 4% das fibras) (Sneddon et al. 2003). Este número reduzido de fibras C nos peixes, em relação aos mamíferos, pode ser explicado pela passagem evolutiva do meio aquático para o terrestre (Sneddon 2004).



**Figura 2 - Posição dos nociceptores polimodais (triângulos), nociceptores mecanotérmicos (diamantes) e nociceptores mecanoquímicos (hexágonos) na cabeça e face da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (fonte: Sneddon et al. 2003).**

## **2.2. Medula espinhal e vias espinhais**

O processamento dos sinais nociceptivos é uma etapa fundamental para a percepção da dor, uma vez que, ao atingirem a medula espinhal são modelados, ou seja, podem ser amplificados ou suprimidos. A medula espinhal divide-se em substância branca (constituída por axónios e fibras nervosas) e em substância cinzenta (constituída por células nervosas) (Gaynor and Muir 2008). A substância cinzenta da medula espinhal é dividida em estratos, de acordo com o tipo de células: o corno dorsal (interneurónios e neurónios ascendentes); a zona intermédia (neurónios pré-ganglionares do sistema nervoso autónomo); e o corno ventral (interneurónios e neurónios motores) (Paeile 2005). Enquanto que, a substância branca é dividida em três pares de colunas bilaterais: as dorsais, que transmitem a informação ao bulbo raquidiano; as laterais, que transmitem a informação sensorial somática ao cérebro; e as ventrais, responsáveis pelo movimento dos músculos esqueléticos (Paeile 2005). A informação modulada na medula espinhal é transportada para o cérebro através dos tratos ou vias nociceptivas, formadas por axónios, que se projetam do corno dorsal da medula até ao cérebro. Consideram-se quatro vias importantes: a via espinotalâmica (via nociceptiva de maior importância), a via espinoreticular, a via espinomesencefálica e, por fim, a via espinohipotalâmica (Lemke 2004).

Estudos com o tubarão *Ginglymostoma cirratum* demonstraram que as fibras ascendentes, que partem da medula, atingem a formação reticular e também se projetam para o núcleo motor do vago, o bulbo, o tronco cerebral, o cerebelo, o núcleo *intercolicularis*, o teto mesencefálico e o tálamo (Ebbesson and Hodde 1981). Consoante as espécies, um ou mais tratos espinhais foram identificados em peixes (Ebbesson and Hodde 1981; Ronan and Northcutt 1990). Embora os mamíferos exibam trajetos espinhais mais recentemente desenvolvidos, os sistemas filogeneticamente mais antigos, tais como os encontrados em vertebrados “inferiores”, são funcionais na percepção da dor em mamíferos (Kevetter and Willis 1984). Dados eletrofisiológicos relataram a presença de atividade no telencéfalo (Dunlop and Laming 2005), medula espinhal, cerebelo e teto ótico (Dunlop and Lamming 2005) em peixes após estimulação nociva cutânea, o que significa que os sinais nociceptivos periféricos atingem o encéfalo. Tudo isto sugere que as vias espinhais, que transmitem e modulam sinais nociceptivos ao cérebro, são filogeneticamente antigas e não se restringem aos tetrápodes. Em geral, tanto os peixes como os tetrápodes possuem uma organização similar das principais vias espinhais, que transmitem sinais neurais dentro da medula espinhal para o cérebro (Ronan and Northcutt 1990).

### **2.3. Neurotransmissores**

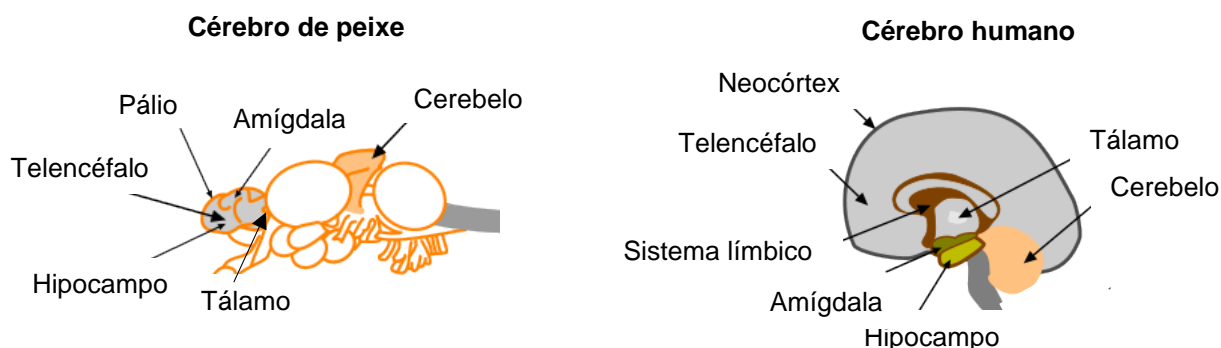
Os sistemas envolvidos na nocicepção exigem um equilíbrio entre os estímulos periféricos e os controles inibidores e excitatórios, que descendem do cérebro, de forma a alcançar a homeostase sensorial. Vários péptidos, que transmitem e modulam sinais nociceptivos, podem ser encontrados nos núcleos cerebrais do tronco cerebral de peixes teleósteos (Cuadrado et al. 1994). Na lampreia, estímulos sensoriais podem ser transmitidos ao cérebro através de neurônios de retransmissão (Buchanan 2001) e são facilitados ou inibidos por certos neuropeptídeos, que são conhecidos por modificar a nocicepção em mamíferos (Ullström et al. 1999). O tipo e a localização dos neuropeptídeos na medula espinhal da lampreia também demonstra fortes homologias com a de outros tetrápodes (Ullström et al. 1999).

### **2.4. Estruturas encefálicas**

É através das estruturas encefálicas que ocorre o fenómeno de percepção, onde são produzidas respostas integradas e coordenadas, de acordo com os estímulos sensoriais a que foram expostos. O encéfalo dos peixes, assim como o de todos os vertebrados, obedece a uma estrutura básica, com a presença de telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo e tronco

cerebral (Striedter 2005) (figura 3). Desta forma, o encéfalo dos peixes inclui a maior parte das regiões envolvidas no processamento da dor.

Estudos recentes têm demonstrado cada vez mais semelhanças entre o desenvolvimento do prosencéfalo de peixes e mamíferos (Mueller and Wullimann 2009). Alguns autores sugerem que, apesar dos peixes possuírem esta estrutura anatômica, a ausência do neocórtex impossibilita a experimentação de qualquer tipo de dor (Rose et al. 2014). Segundo Rose et al. (2014), o tronco cerebral e as regiões subcorticais são capazes de modular a percepção da dor, mas apenas através de conexões com o córtex, nunca na ausência deste. No entanto, estudos em pacientes com córtex não funcional revelaram que a sensação de dor não se encontra completamente abolida, mas sim, uma percepção de dor limitada, de qualidade diferente daquela do córtex funcional (Segner 2012). De acordo com Perl (2007), apenas quando a lesão ocorre no tálamo é que a capacidade de sentir dor é abolida, e não quando a lesão ocorre ao nível do córtex cerebral. Portanto, o tálamo é a estrutura fulcral para a percepção da dor (Perl 2007).



**Figura 3 – Anatomia do cérebro de peixe versus cérebro humano (Adaptado de: <http://www.fishpain.com/fish-and-pain-brain-structures.htm>).**

#### **2.4.1. Telencéfalo**

O telencéfalo dos peixes recebe extensas projeções neurais do tálamo e de outros núcleos de retransmissão especializados (Ito et al. 1986; Zupanc 1997), medeia a integração sensorial e funções executivas análogas às do telencéfalo tetrápode (Chandroo et al. 2004). O registo de eléctrodos colocados em diferentes partes do cérebro da truta arco-íris e peixe-dourado demonstraram que, a colocação de um pino na pele, logo atrás do opérculo, gera um sinal nociceptivo que desencadeia atividade no cerebelo, *tectum* e telencéfalo (prosencéfalo) (Dunlop and Laming 2005), o que indica que os impulsos nociceptivos estão sujeitos a processamento em várias regiões cerebrais.

#### **2.4.2. Pálio**

O córtex cerebral dos mamíferos teve origem, ao longo da evolução, no pálio (Striedter 1997), que consiste numa massa cinzenta que reveste o telencéfalo (Chandroo et al. 2004). O pálio espessou-se em várias camadas em diferentes classes de vertebrados e apresenta-se como uma estrutura laminada em mamíferos, que é o córtex cerebral (Striedter 1997). Embora o pálio do peixe não seja laminado, exceto nalgumas espécies (Wicht and Northcutt 1998), há evidências crescentes sugestivas de que se desenvolveu numa estrutura altamente diferenciada em relação ao processamento de informações sensoriais (Bradford 1995). Segundo Mueller and Wullimann (2009) o pálio dos mamíferos possui quatro regiões: uma medial (hipocampo); uma dorsal (isocórtex de seis camadas); uma ventral (parte do complexo amigdalóide palial); e uma lateral (córtex piriforme e outras partes do complexo clastromigdalóide) (Mueller and Wullimann 2009). Mueller et al. (2011) demonstraram que, tal como nos mamíferos, o pálio do peixe zebra possui estas divisões homólogas ao pálio dos mamíferos. Para além das evidências anatómicas, dados comportamentais (Portavella et al. 2002), genéticos (Rink and Wulliman 2001) e hodológicos (Northcutt 2006; Northcutt 2008), têm suportado a homologia entre a região medial e o complexo amigdalóide palial, entre a região lateral e o hipocampo dos mamíferos. Também foi proposta a analogia entre o pálio dorsal e o (neo) córtex mamífero, devido à existência de conexões desta região com outras regiões encefálicas de forma similar à observada nos tetrápodes, assim como a homologia de marcadores genéticos do pálio dorsal dos peixes e do neocórtex dos mamíferos (Wullimann and Muller 2004). O neocórtex desenvolveu-se a partir do pálio dorsal e esta subdivisão palial está presente em todos os amniotas, possivelmente todos os tetrápodes, e partilha um número similar de tipos celulares e conexões (Medina and Abelan 2009). Os peixes possuem um hipotálamo que está envolvido em funções sexuais e no comportamento social e integra sinais de origem telencefálica relacionados com as respostas de medo (Chandroo et al. 2004).

#### **2.5. Substâncias opióides endógenas e recetores**

Tal como a adrenocorticotrofina é libertada em mamíferos, opióides endógenos também são produzidos em tetrápodes aquando de estímulos nocivos (Zieglgänsberger 1986). Sneddon (2003) demonstrou que a morfina age como um analgésico na truta arco-íris ao ocorrer uma redução, induzida pelo opióide, de comportamentos relacionados com dor, como a taxa de batimentos operculares.

Através da utilização de antagonistas de opiáceos, Ehrensing et al. (1982) descobriram que, a analgesia da morfina em peixes pode ser bloqueada através de mecanismos de ação semelhantes aos dos tetrápodes. No peixe-zebra, a distribuição e o tipo de recetores opióides no SNC sugerem uma atividade sensorial ou analgésica e ainda a conservação de algumas vias nociceptivas ao longo da evolução dos vertebrados (Porteros et al. 1999).

**Tabela 1 – Resumo das semelhanças entre peixes e mamíferos, no processo neurofisiológico da dor, a nocicepção.**

<b>Semelhanças entre peixes e mamíferos</b>	
<b>Sistema nociceptivo</b>	Presença de nociceptores e fibras nocicetoras Aδ e C, e variação da resposta dos nociceptores consoante o tipo de danos, tal como nos mamíferos (Sneddon et al. 2003)
<b>Medula espinhal e vias espinhais</b>	Organização similar das principais vias espinhais, que transmitem sinais neurais dentro da medula espinhal para o cérebro (Ronan and Northcutt 1990).
<b>Neurotransmissores</b>	Vários péptidos, que transmitem e modulam sinais nociceptivos, podem ser encontrados nos núcleos cerebrais do tronco cerebral de peixes teleósteos (Cuadrado et al. 1994).
<b>Estruturas encefálicas</b>	O encéfalo dos peixes obedece a uma estrutura básica, com a presença de telencéfalo, mesencéfalo, diencefalo e tronco cerebral (Striedter 2005).
<b>Telencéfalo</b>	O telencéfalo de peixes medeia a integração sensorial e funções executivas análogas às do telencéfalo tetrápode (Chandross et al. 2004).
<b>Pálio</b>	Evidências anatómicas, dados comportamentais, genéticos e hodológicos suportam a homologia entre as regiões do pálio de peixes com estruturas anatómicas existentes nos mamíferos (Portavella et al. 2002, Rink and Wulliman 2001; Northcutt 2006; 2008).
<b>Substâncias endógenas opióides e recetores</b>	Opioides endógenos também são produzidos em tetrápodes (Zieglängsberger 1986). A analgesia da morfina em peixes pode ser bloqueada através de mecanismos de ação semelhantes aos dos tetrápodes (Ehrensing et al.1982)

De forma a sistematizar a informação abordada relativa à nocicepção em peixes, na tabela 1 encontra-se o resumo das semelhanças do processo fisiológico da dor entre peixes e mamíferos. Contudo, estas semelhanças não indicam que os peixes possuem as mesmas capacidades cognitivas que os mamíferos, mas sugerem continuidade nas funções encefálicas e nos correlatos neurais de estados mentais no decorrer da evolução, ao invés de uma divisão rígida entre vertebrados pré e pós neocórtex (Segner 2012).

A tabela 2 apoia esta continuidade, com alguns exemplos de respostas comportamentais evocadas, por parte dos peixes, quando sujeitos a estímulos. À medida que continuamos a descobrir mais sobre a neuroanatomia e neurofisiologia dos peixes, é cada vez mais aceite que a função do encéfalo vai muito mais além do que processamento olfatório, como originalmente se pensava (Segner 2012).

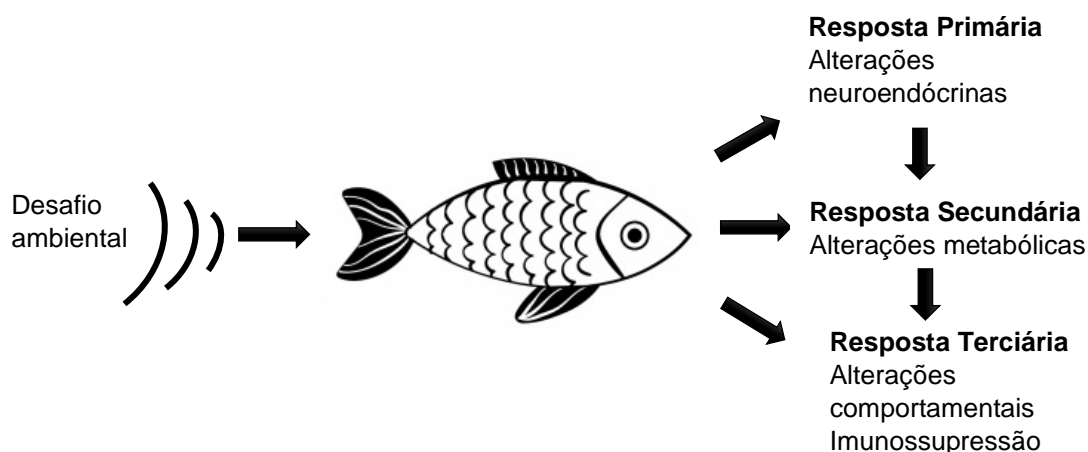
**Tabela 2 – Exemplos de respostas comportamentais evocadas por peixes, aquando sujeitos a estímulos.**

	<b>Resposta comportamental</b>
<b>Injeção de ácido acético nos lábios</b> Truta arco-íris	Comportamento de “rubbing”; esfregar os lábios na parede do aquário; “rocking”; demoraram mais tempo a ingerir o alimento; aumento da taxa de batimentos operculares (Sneddon 2003); perda de equilíbrio (Sneddon 2003); (Newby and Stevens 2008). O mesmo aconteceu com peixe zebra ( <i>Danio rerio</i> ) (Reilly et al. 2008).
<b>Injeção subcutânea de formalina na barbatana adiposa</b> Piaçu	Grande aumento da atividade locomotora, sobretudo no minuto inicial; aumento da frequência respiratória (Alves et al. 2013).
<b>Clipe na cauda</b> Tilápia do Nilo	Aumento da atividade natatória; libertação de muco pelas células das brânquias (Roques et al. 2010).

### 3. Resposta ao stress em peixes

O stress na piscicultura é um parâmetro que requer especial atenção, pela influência no bem-estar dos peixes, assim como pelo efeito negativo na qualidade do produto final (Lambooij et al. 2002; Ashley 2007). Pickering (1981) definiu “stress” como o conjunto de respostas do organismo a estímulos adversos de origem interna ou externa, que perturbam ou ameaçam o seu equilíbrio homeostático. Aquando de estímulos nocivos é evocada atividade neural, a partir das vias sensoriais, com posterior ativação dos neurónios hipotalâmicos que iniciam respostas (Bonga 1997). Tal como acontece com os outros vertebrados, os peixes respondem aos desafios ambientais com uma série de ajustes neuroendócrinos adaptativos, que se denominam de “resposta ao stress” (Braithwaithe and Ebesson 2014). Esta resposta compreende mudanças metabólicas e comportamentais (Alves et al. 2013), que melhoram a capacidade dos peixes em superar ou evitar desafios. Em contraste, a ativação prolongada da resposta ao stress é prejudicial, com consequente imunossupressão, crescimento reduzido e disfunção reprodutiva (Braithwaithe and Ebesson

2014). De acordo com Barton (1997) a “resposta ao stress” compreende 3 níveis: resposta primária; resposta secundária; e resposta terciária (figura 4).



**Figura 4 – Diagrama da resposta ao stress em peixes.**

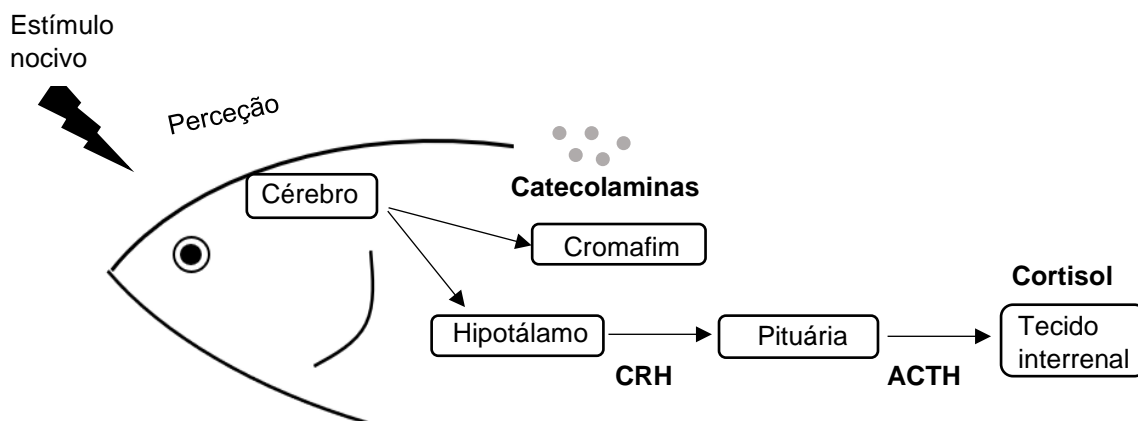
### **3.1. Resposta primária ao stress**

A resposta primária traduz-se por alterações neuroendócrinas (catecolaminas e corticosteroides). A resposta neuroendócrina ao stress em peixes é semelhante à dos mamíferos, é mediada pelo sistema adrenérgico e pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) (Weber 2011).

Aquando da percepção de um estímulo nocivo, por estimulação neural, o peixe inicia uma libertação rápida de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) do tecido cromafim, acompanhada pela libertação da hormona libertadora de corticotropina (CRH) do hipotálamo (Braithwaite and Ebbesson 2014) (figura 5). O sistema CRH é importante na coordenação da resposta ao stress em vertebrados (Flik et al. 2006), uma vez que promove a libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) pela glândula pituitária e subsequente síntese e secreção de cortisol, pelo tecido interrenal (Acerete et al. 2004).

O cortisol desempenha um papel fundamental na alostase que, sob condições basais promove a função adequada de várias hormonas e, desta forma, permite que os animais recuperem do stress (Flik et al. 2006). O cortisol liga-se a recetores de mineralocorticóides (MR) e os recetores de glucocorticóides (GR) em tecidos-alvo, a fim de desencadear respostas comportamentais e fisiológicas adicionais (Braithwaite and Ebbesson 2014). Assim, são estes recetores que regulam os níveis de cortisol. Os recetores mineralocorticóides apresentam sensibilidade a níveis baixos de cortisol, influenciam o equilíbrio hídrico no corpo, tal como o “feedback” negativo do cortisol ao longo dos ciclos diários e o metabolismo da glucose (De Kloet 2004). Os recetores glucocorticóides apresentam menor afinidade pelo cortisol e detetam-no quando está presente em altas concentrações e, por isso, estão envolvidos na resposta ao stress e subsequente recuperação (Johnson et al. 1992).

As catecolaminas aumentam rapidamente no organismo, onde permanecem por algumas horas, enquanto o cortisol pode permanecer alto durante 24h após o estímulo, consoante a espécie e o tipo de agente nocivo (Acerete et al. 2004). O cortisol é conhecido como a hormona do stress, e um dos seus principais indicadores em peixes (Acerete et al. 2004), uma vez que, através do aumento da sua concentração, é possível quantificar a intensidade do stress.



**Figura 5 - Diagrama geral da resposta primária ao stress em peixes: alterações neuroendócrinas.**

### 3.2. Resposta secundária ao stress

A resposta secundária traduz-se pelas alterações metabólicas. Nos casos em que o stress perdura, em consequência da resposta primária, pode desencadear respostas secundárias, para tentativa de resistência e adaptação (Weber 2011). Assim, o aumento de cortisol e catecolaminas circulantes pode resultar numa série de alterações:

- podemos destacar como resposta secundária a hiperglicemia, em que o organismo solicita energia extra, principalmente por glicogenólise das reservas musculares e hepáticas, para que consiga adaptar-se à condição adversa (Barton 2002). Os corticoesteroides mantêm a hiperglicemia ao estimular o catabolismo proteico e a gliconeogénese (Thomas 1990);
- alterações hematológicas, como hemodiluição ou hemoconcentração, com alteração dos valores de hematócrito e outros parâmetros hematológicos (McDonald and Milligan 1997). Segundo Chen et al. (1995), a diminuição do hematócrito é observada em várias espécies submetidas a estímulos stressantes agudos;
- alteração do peso dos peixes, como a perda de peso em espécies marinhas e ganho em espécies de água doce (Mazeaud et al. 1977). A elevação dos níveis de adrenalina induz o aumento da permeabilidade do epitélio branquial à passagem de água, com consequente alteração nos níveis de eletrólitos sanguíneos, em ambientes híper ou hipotónicos (Cech et al. 1996);



### 3.3. Resposta Terciária ao stress

Por último, a resposta terciária abrange as alterações comportamentais, comprometimento do desempenho e suscetibilidade a doenças. A resposta terciária é o resultado do stress crónico, que conduz a exaustão fisiológica com consequências negativas a longo prazo, como alteração do sistema imunitário e reprodutivo, diminuição da taxa de crescimento e da sobrevivência global (Barton and Iwama 1991). Estudos demonstraram que o stress crónico pode reduzir (ou esgotar) os níveis de cortisol e/ou comprometer a resposta normal ao stress (Nordgreen et al. 2009). A avaliação, potencialmente mais confiável, de stress crónico é feita através da medição do peptídeo derivado de pró-opiomelano (derivado de POMC), hormona estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH), libertado pela glândula pituitária, que permanece elevado em peixes com stress crónico (Flik et al. 2006).

### 4. Efeito do stress inerente ao abate na qualidade do peixe

Como a indústria de aquacultura se encontra em expansão, existe um crescente interesse e preocupação com a adoção de melhores práticas de gestão e produção, incluindo a etapa do abate (Southgate and Wall 2001). Embora o abate de mamíferos e aves para consumo humano seja regulamentado por leis, decretadas em muitos países (incluindo todos os países membros da União Europeia) (Caporale et al. 2005), a maioria ainda não abrange os peixes de produção (Robb et al. 2000a). Apesar da sensibilidade do público geral em relação ao bem-estar dos peixes não ser tão desenvolvida como em mamíferos e aves, a preocupação com os animais aquáticos está a ganhar, cada vez mais, interesse científico e do cidadão (Chandroo et al. 2004). Para um abate ser considerado como ético, a perda da consciência deve ser imediata, ou ser realizado de forma a evitar dor e sofrimento. Atualmente existem vários métodos de atordoamento e abate de peixes, alternativos ao abate praticado na pesca tradicional (asfixia por exposição ao ar). No entanto, não há nenhuma evidência de qual o melhor método a ser utilizado, até porque a resposta varia consoante a espécie de peixe. Contudo, é certo que as práticas não éticas, para além de comprometerem o bem-estar animal, também prejudicam a qualidade do peixe (Lamboij et al. 2006).

O stress inerente ao abate influencia diretamente a atividade muscular, e assim as reservas energéticas, o ATP (adenosina trifosfato). Um grande consumo de ATP acelera a resolução do *rigor mortis*, momento em que se inicia a autólise (Bagni et al. 2007; Rahmanifarah et al. 2011). Desta forma, a deterioração da qualidade pode ser retardada através da escolha de práticas de abate com ética, e assim obter produtos de melhor qualidade (Conte 2004).

A qualidade é um termo amplo que abrange atributos como a segurança dos alimentos, das características organolépticas, o valor nutricional e a frescura, de forma a influenciar o

consumo do alimento. No caso do peixe, a frescura assume um papel importante, uma vez que é o primeiro critério a contribuir para aceitação ou rejeição do produto (Nunes and Batista 2004). O peixe é um alimento altamente perecível, devido à particularidade do seu “habitat”, à sua composição química e a um conjunto de processos de natureza físicoquímica, bioquímica e microbiológica, que culminam em alterações sensoriais e de textura (Nunes and Batista 2004). Juntamente com a bioquímica do músculo *ante mortem*, os processos bioquímicos *post mortem* estão diretamente relacionados com a qualidade final (Daskalova 2019). Assim, a manipulação adequada do peixe desempenha um papel importante, ao determinar a intensidade e rapidez do desenvolvimento das alterações *post mortem*, que por norma seguem as etapas: *rigor mortis*; autólise, que coincide com a resolução do *rigor mortis*; e deterioração bacteriana. A rapidez de cada estágio depende das espécies de peixe, da contaminação microbiana, de temperatura e também da condição fisiológica (Ehira and Uchiyama 1987). Desta forma, a etapa do abate torna-se importante, na medida em que o esforço físico e a fadiga inerentes a esta etapa provocam alterações ao nível molecular devido à extinção dos recursos energéticos (ATP, glicogénio, etc.). Assim, aquando de abates stressantes que ocasionam reações aversivas nos peixes, existe um esgotamento rápido das reservas de energia (glicogénio), com *rigor mortis* precoce e, por sua vez, uma deterioração mais rápida e intensa, o que interfere no grau de frescura e consequentemente na qualidade do produto final. Portanto, abates com ética, onde a resposta de stress é reduzida, promovem o aumento do tempo de vida útil do produto.

#### **4.1. Evolução do músculo *post mortem***

A anatomia muscular dos peixes difere da dos mamíferos terrestres. Ao contrário destes, os peixes não possuem um sistema tendinoso para ligar os feixes musculares ao esqueleto do animal. No entanto, apresentam feixes de células musculares paralelas, unidas a bainhas de tecido conjuntivo (miocomata), de forma a serem ancoradas no esqueleto e na pele (FAO 1995). Tal como nos mamíferos, o tecido muscular dos peixes é composto por músculo estriado esquelético e liso, onde a unidade funcional, a célula muscular, contém sarcoplasma, glicogénio, mitocôndrias, miofibrilas (contêm as proteínas contráteis actina e miosina). No tecido muscular do peixe podem ser encontrados três grupos de proteínas: as proteínas estruturais (actina, miosina, tropomiosina e actomiosina), que constituem 70-80% do teor total de proteína (em comparação com 40% em mamíferos) e são responsáveis pelo movimento contrátil muscular; as proteínas sarcoplasmáticas (mioalbumina, mioglobulina e enzimas), que constituem 25-30% da proteína; e as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), que constituem aproximadamente 3% da proteína em teleósteos e cerca de 10% em elasmobrânquios (comparado com 17% em mamíferos) (FAO 1995).

Existe uma série de funções reguladoras e bioquímicas que operam no músculo *in vivo*. A contração muscular tem início quando o impulso nervoso desencadeia uma libertação de  $\text{Ca}^{++}$  para as miofibrilas, com ativação da ATP-ase. O ATP presente entre os filamentos de actina e miosina é degradado, com libertação de energia, o que permite que filamentos de actina deslizem entre os filamentos de miosina (de forma telescópica), com consequente contração da fibra muscular (FAO 1995). O músculo relaxa quando o organismo inibe a atividade da ATP-ase, e assim os filamentos deixam de deslizar um sobre o outro, de forma a finalizar a atividade contrátil. Após a morte, estas funções reguladoras cessam, e os recursos energéticos do músculo esgotam. Quando o nível de ATP atinge o limiar mínimo, a miosina e a actina interligam-se de forma irreversível, o que conduz ao estado de *rigor mortis*. Assim, logo após a morte do peixe dá-se início a um processo de transformação no músculo que culmina na putrefação. Esta evolução no músculo é de grande importância na ótica comercial e é possível distinguirem-se três fases/estados: pré-rigor, *rigor mortis* e pós-rigor (Sainclivier 1983).

#### **4.1.1. Pré-rigor**

Imediatamente após a morte do peixe, os músculos estão macios e moles e com flexibilidade (FAO 2001). Aquando da paragem da função cardíaca e interrupção da circulação sanguínea, para compensar a supressão de oxigénio no tecido muscular, o glicogénio é oxidado pelas enzimas tecidulares para produzir adenosina trifosfato (ATP) (FAO 1995). Sob condições anaeróbias o ATP também pode ser sintetizado pela via creatina fosfato. Contudo, para a maioria dos peixes teleósteos, a glicólise é o único meio possível para a produção de energia (FAO 1995). Os músculos permanecem flexíveis por um período de tempo até as reservas de energia se esgotarem (FAO 2001). Após a morte, através da glicólise em anaerobiose, apenas são produzidos 2 moles de ATP para cada mole de glucose oxidada, em comparação com 36 moles de ATP na mitocôndria do animal vivo, daí esta condição de flexibilidade muscular ser durante um período de tempo limitado (FAO 1995). O estado fisiológico do peixe no momento da morte, em particular o nível de stress e exaustão inerente ao abate influencia os níveis de glicogénio, fosfocreatina e ATP e, por sua vez, o período da fase pré-rigor.

#### **4.1.2. Rigor mortis**

O *rigor mortis* resulta de uma série de processos catabólicos, que induzem a rigidez muscular de um peixe após a morte. Aquando depleção de ATP, a menos de  $2\ \mu\text{M}$  ATP, a actina e miosina formam o complexo actomiosina inextensível, o que provoca a rigidez de

todo o corpo e, assim, a transição do estado pré-rigor para o de *rigor mortis* propriamente dito (Reedy et al. 1965). O *rigor mortis* em peixes, geralmente, começa na cauda, e os músculos endurecem gradualmente ao longo do corpo em direção à cabeça, até que o peixe inteiro esteja rígido (FAO 2001). Contudo o *rigor mortis* também pode começar na cabeça e endurecer em direção à cauda (Erikson 2001). O peixe permanece rígido por um período de tempo que pode variar de uma hora a três dias e, posteriormente, os músculos amolecem novamente (FAO 2001).

#### **4.1.3. Pós-rigor**

Depois de algumas horas ou dias, os músculos começam a amolecer de forma gradual e tornam-se novamente moles, o que confere ao músculo uma condição de pós-rigor. Assim, a resolução do *rigor mortis* ocorre quando o músculo relaxa novamente e recupera a flexibilidade, mas não recupera a elasticidade característica do estado pré-rigor (FAO,1997). Após a morte do peixe as enzimas continuam a atuar e algumas agem sobre a flexibilidade do músculo (FAO 2001). Como já foi abordado anteriormente, em vida o músculo contrai e relaxa através da interação dos dois principais componentes proteicos (actina e miosina). No entanto, no músculo *post mortem*, após um determinado período de tempo, a ligação é inibida. A origem deste estado parece ter origem autolítica, uma vez que de forma paralela, ocorrem reações de degradação celular, como a autólise dos tecidos, desnaturação proteica, libertação de ácidos gordos e desorganização progressiva do aparelho contrátil (Sainclivier 1983). Estes processos degradativos são responsáveis pelo retorno do relaxamento muscular (Barroso et al. 1997). Tal como o estabelecimento do *rigor mortis*, a resolução também pode variar consoante a espécie, a temperatura, a manipulação, o tamanho e as condições fisiológicas do peixe (FAO,1997).

#### **4.2. Influência do stress no desenvolvimento do *rigor mortis***

A resposta ao stress em peixes é caracterizada pelo aumento da atividade muscular, o que conduz ao esgotamento das reservas de energia nos músculos e à aceleração dos processos inerentes ao metabolismo muscular *post mortem* (Daskalova 2019). Com o aumento da atividade muscular, o consumo das reservas energéticas reduz o ATP disponível no músculo *post mortem* necessário para manter o músculo flexível, o que é responsável pelo estabelecimento de *rigor mortis* mais rápido.

Forgan et al. (2010) demonstraram que, peixes sujeitos a stress, para além de apresentarem níveis de glicogénio muscular, fosfato de creatina e ATP significativamente mais baixos, apresentaram um pH inicial mais reduzido, em comparação com grupos de peixes não stressados (Forgan et al. 2010). O esgotamento das reservas de glicogénio

conduz à formação de lactato, que se acumula nos músculos e em menor grau no fígado e no sangue (Padmavathy and Ramanathan 2010). Foi também sugerido que o dano físico no músculo associado à rápida instalação do *rigor mortis* aumenta as ruturas celulares com a libertação de enzimas catalíticas e com aumento da oxidação lipídica (Morzel e Van de Vis 2003). Giuffrida et al. (2007) relataram que uma grande depleção de ATP está associada a uma intensa oxidação lipídica na truta arco-íris e dourada.

O stress inerente ao abate influencia o *rigor mortis*, na medida em que a taxa e a extensão do declínio do ATP e do pH nos tecidos musculares estão ligadas de forma indissociável à taxa de desenvolvimento do *rigor mortis*. Jerret and Holland (1998) demonstraram que, um peixe controlo, atingiu um *rigor mortis* máximo médio em cerca de 8 horas após a morte, enquanto que o peixe altamente stressado, entrou em *rigor mortis* 30 minutos após a morte.

#### **4.3. Importância tecnológica do *rigor mortis***

O desenvolvimento do *rigor mortis* interfere tanto no processamento do peixe, como na taxa de involução da frescura, o que envolve a qualidade do produto final. O *rigor mortis* tem um significado tecnológico relevante, em especial para a indústria de congelação de peixe, seja como peixe inteiro ou como filetes (FAO 2001). Na fase de *rigor mortis* o corpo do peixe encontra-se completamente rígido, o que reduz o rendimento da filetagem (o músculo escuro pode encolher até 52% e o músculo branco até 15% do comprimento original) e o manuseamento neste estado de rigidez é dificultado, o que pode causar danos (Buttkus 1963). Assim, a duração do período de pré-rigor é essencial no processamento de peixe (FAO 1995). Quando o stress e a atividade muscular antes do abate são minimizadas, o processamento do peixe, como a filetagem e empacotamento, pode ser realizado antes do início do *rigor mortis*, o que aumenta o rendimento e reduz possíveis danos (Poli et al. 2005). Foi demonstrado, através de um conjunto de estudos, que a filetagem no estado pré-rigor conduz a uma redução significativa da incidência e da gravidade do *gaping* (afastamento muscular), melhor cor e textura mais firme dos filetes (Roth et al. 2009). Para Skjervold et al. (2001), os consumidores de peixe preferem uma textura firme, uma vez que o amolecimento do peixe está associado à quebra da estrutura muscular e muitas vezes resulta num baixo rendimento e menor qualidade do produto (Godiksen et al. 2009). Também foi demonstrado que a filetagem pré-rigor pode estar associada a um crescimento bacteriano mais lento, com consequente prolongamento da vida útil dos filetes (Tobiassen et al. 2006).

A fase de resolução do *rigor mortis* também é relevante, uma vez que coincide com as alterações autolíticas, como a degradação dos catabolitos do ATP (FAO 1995). Isto é particularmente importante, uma vez que a autólise favorece o crescimento bacteriano, o que

acelera a deterioração e reduz, de forma significativa, o valor comercial do peixe (Aksnes and Brekken 1988). Desta forma, o atraso da resolução do *rigor mortis* contribui para o aumento do tempo de vida útil do peixe.

## **5. Métodos de atordoamento e abate de peixes**

Atualmente, existem vários métodos de atordoamento e abate de peixes, que são utilizados consoante a espécie, qualidade desejada e a procura do mercado. Em Portugal, o método mais comum na atividade piscícola é a termonarcose, pela facilidade da aplicação e por proporcionar bons resultados na qualidade do produto final (Poli et al. 2005; Ashley 2007).

No setor de produção animal, devem estar garantidas condições de ética, desde as etapas de criação até ao momento do abate. Como princípio geral, quando o método de abate não garante a insensibilização/perda de consciência imediata, deve existir uma insensibilização prévia (OIE 2012). Assim, o abate de peixes pode ser executado em duas fases: os peixes devem ser imediatamente conduzidos ao equipamento de insensibilização, para induzir e garantir um estado de insensibilização/perda de consciência (1ª fase); e de seguida sacrificado pelo método de abate, que deve ser realizado de forma rápida e completa (2ª fase) (Lines et al. 2003). Estas duas fases podem ocorrer juntas ou separadas. Aquando de operações distintas, o tempo de insensibilização até à morte deve ser o menor possível, para evitar qualquer recuperação da consciência (Lines et al. 2003). De acordo com a *Humane Slaughter Association* (HSA), o sistema ideal de abate de peixes engloba métodos que não removem os animais da água. Quando tal não acontece, os peixes não devem permanecer fora de água por mais de 15 segundos, pois após este período os animais demonstram um comportamento aversivo (HSA 2014). Em algumas práticas o processo é individual, enquanto noutras é coletivo.

### **5.1. Asfixia**

A asfixia é o método mais comumente praticado em peixes (Poli et al. 2005). O animal morre por anóxia e o período de tempo necessário para que a morte ocorra varia consoante a espécie, temperatura ambiente e se o procedimento ocorre dentro ou fora de água (Robb and Kestin 2002; Southgate and Wall 2001; Poli et al. 2005). Como a maioria dos peixes é ectotérmica, o processo de anóxia é prolongado sempre que a temperatura do ar/água estiver mais reduzida.

### 5.1.1. Asfixia por exposição ao ar

A asfixia por exposição ao ar é o método mais comum e mais antigo, a nível mundial, para o abate de peixes (Robb and Kestin 2002). Estes são removidos da água e expostos ao ar, sufocam e acabam por morrer. Ao serem removidos da água, ocorre colapso das brânquias, com consequente redução da área de troca de oxigénio e, seguidamente anóxia e morte (Southgate and Wall, 2001). A asfixia por exposição ao ar é extremamente aversiva para a maioria das espécies de peixes, que demonstram comportamentos de fuga violentos, com aumento do risco de hemorragias e hematomas, acompanhados de respostas máximas ao stress (Robb and Kestin 2002; Poli et al. 2005). Este é considerado um dos métodos mais stressantes, em que o animal permanece consciente por longos períodos de tempo antes que a morte ocorra (Erikson et al. 1997; Ottera et al. 2001). Por consequência, várias autoridades (como a AVMA, EFSA e FAWC), não consideram a asfixia por exposição ao ar, para o abate de peixes, como uma prática ética (FAWC 1996; EFSA 2004).

**Tabela 3 – Período de tempo necessário para a insensibilização ser alcançada, por asfixia por exposição ao ar, em diferentes espécies de peixes.**

<b>Espécie de peixe</b>	<b>Insensibilização total</b>
Truta arco-íris	Após 2,6 minutos a 20°C; 3 minutos a 14°C; e 9,6 minutos a 2°C (Kestin et al. 1991).
Salmão do Atlântico	Após 2-3 minutos a 20°C; e 14 minutos a 2°C (Robb et al. 2000b).
Enguias	Podem sobreviver por muito tempo (> 24 horas) fora de água, especialmente em condições de humidade (Robb and Kestin 2002; Poli et al. 2005).
Carpas europeias	São muito tolerantes à hipóxia (Håstein et al. 2005). São necessárias quase 5 horas para os movimentos operculares cessarem, uma vez removidos da água (Rahmanifarah et al. 2011).
Pregado	A exposição ao ar até 4 minutos não induziu resposta fisiológica ao stress (Mugnier et al. 1998). As necessidades de oxigénio (30%) são realizadas através da pele (Morzel et al. 2002).

### 5.1.2. Asfixia em água à temperatura ambiente

Este método consiste na colocação dos peixes num recipiente com água à temperatura ambiente, não arejada. Como resultado da redução do teor de oxigénio na água, em conjunto com a acumulação de metabolitos tóxicos (como a amónia), o peixe acaba por morrer por anóxia (Diggles and Landos 2012). O intervalo de tempo até à morte pode ser muito mais prolongado do que a asfixia por exposição ao ar (Kestin et al. 1997). A asfixia em água à temperatura ambiente é altamente stressante, os peixes apresentam reações aversivas. Num estudo com robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), foram necessários 128 minutos para a insensibilização ser conseguida (Poli 2009; Acerete et al. 2009).

### 5.1.3. Asfixia em água gelada/ pasta de gelo

Também conhecida por termonarcose, hipotermia ou choque térmico. Os peixes são transferidos para um tanque com pasta de gelo ou água gelada (EFSA 2009d). A adição de gelo à água, em proporções iguais ou superiores a 1:1, forma uma pasta de gelo com temperaturas da água entre -2 e 2°C. Os peixes morrem por anóxia, devido ao colapso das brânquias provocado pela água gelada (Skjervold et al. 2002). A temperatura corporal do peixe, colocado numa pasta de gelo a 0-2 ° C, diminui de forma logarítmica, consoante a temperatura inicial e a massa corporal dos peixes (Morzel et al. 2002). Grande parte do calor é perdido pela superfície corporal e barbatanas (Stevens and Sutterlin 1979). A taxa de diminuição da temperatura dos peixes varia consoante as diferenças fisiológicas e anatómicas das espécies de peixes (Skjervold et al. 2002).

É um método muito utilizado em espécies de água quente, devido à diferença de temperatura (Acerete et al. 2004; Lambooi et al. 2006; Ashley 2007). Quando existe uma grande diferença entre a temperatura do ambiente em que o peixe vive e a pasta de gelo/água gelada, o choque térmico pode diminuir drasticamente o período de tempo até à perda da função cerebral, desta forma a inconsciência pode ocorrer quase imediatamente após a colocação na pasta de gelo/água gelada e de seguida ocorre a morte (Wilson et al. 2009; Blessing et al. 2010). Pelo contrário, nos peixes de água fria é necessário um período de tempo mais longo (Ashley 2007). A imersão em pasta de gelo/água gelada não parece particularmente stressante para as espécies mediterrâneas de águas quentes, como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo europeu (Bagni et al. 2002). Espécies de peixes tolerantes à hipoxia como bagre (*Ictaluridae*) e as carpas (*Cyprinidae*), necessitam de um período de tempo mais longo, em comparação com as mais ativas, como salmonídeos (Wall 2001; Davie and Kopf 2006).

Este método é considerado stressante, uma vez que são observadas respostas aversivas nos animais conscientes (Robb and Kestin 2002). Já em termos de qualidade é



considerado como benéfico para a qualidade do peixe, ao retardar a resolução do *rigor mortis*, e, assim, a degradação muscular (Skjervold et al. 2001).

**Tabela 4 - Período de tempo necessário a para insensibilização ser alcançada por termonarcose/choque térmico/hipotermia, em diferentes espécies de peixes.**

<b>Espécie de peixe</b>	<b>Insensibilização total</b>
Salmonídeos	Nas espécies adaptadas ao frio como os salmonídeos podem ser necessárias até 3 horas (Southgate and Wall 2001).
Truta arco-íris	9,6 minutos após transferência de água a 14 ° C para uma pasta de gelo (Kestin et al.1991).
Robalo Europeu	34 minutos após transferência de água a 19,5 ° C para pasta de gelo (Acerete et al. 2009).
Carpas europeias	11 minutos para perder o equilíbrio, após transferência de água a 23°C para água a 0,6-1,5°C e 33 minutos para ausência de resposta a estímulos (Rahmanifarah et al. 2011).
Peixe-zebra	7 segundos, quando transferido de água a 28°C para água a 2°C (Wilson et al. 2009). É recomendado o uso de água gelada para a eutanásia do peixe-zebra, tendo em conta o reduzido tempo até à morte e poucos sinais de sofrimento (Wilson et al. 2009).
Sargo	0,1 min para perder o equilíbrio e 0,34 minutos para insensibilização total, quando transferido de água a 25,5°C para uma suspensão de gelo (1: 1) a 0-2 °C (Blessing et al.2010).
Pregado	Morzel et al. (2002), demonstraram que, após 25 e 55 minutos, a temperatura corporal de 500 gramas de pregado diminuiu de 16°C para 5°C e 3°C, respetivamente, quando colocados em uma suspensão de gelo a 1°C.
Enguias europeias	Não ocorreu em 5% das enguias europeias quando transferidas da água a 18°C para água gelada (média de 0,2°C) (Lambooi et al. 2002)

## 5.2. Métodos mecânicos

### 5.2.1. Percussão craniana

O abate por percussão craniana consiste na aplicação de um golpe ou golpes na cabeça, dorsalmente, a meio do crânio e acima da linha média que une os olhos (EFSA 2009a). Pode ser aplicado manualmente com a utilização de um martelo ou similar, ou de forma automática através de um dispositivo, com disparo de um parafuso não penetrante impulsionado pela pressão do ar (EFSA 2009a). Quando o golpe é aplicado de forma correta e com força adequada, ocorre perda imediata de todos os movimentos e da função cerebral (Lambooy et al. 2002). Contudo, se aplicado de forma incorreta ou com força insuficiente, a inconsciência pode não ser imediata (Robb et al. 2000b) ou pode ser recuperada (Davie and Kopf 2006). Por esta razão alguns autores recomendam que, a percussão craniana, deve ser seguida de sangria ou decapitação (Davie and Kopf 2006).

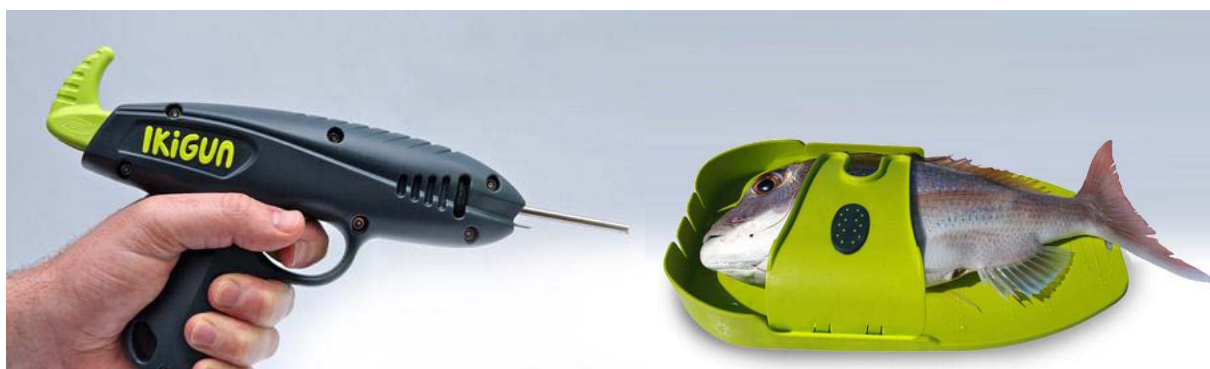
O abate de peixes por percussão é considerado uma das práticas mais rápidas e éticas (Davie and Kopf 2006). Além disso, este método requer pouca habilidade, não é necessária muita precisão para induzir inconsciência (Davie and Kopf 2006), e resulta na diminuição da atividade física, associada a stress mínimo, com benefício para a qualidade do peixe (Poli et al. 2005; Duran et al. 2008; Digre et al. 2011). É utilizado, principalmente, em peixes de maiores dimensões, como o salmão do Atlântico (Robb 2008). Foi o único método testado que provocou a morte imediata em peixe achatado como o pregado (*Psetta maxima*) (Morzel et al. 2002). No entanto, alguns autores consideram que, a percussão, não é adequada para o abate de certas espécies de peixes como as enguias (Van de Vis et al. 2001).

### 5.2.2. Iki jime

Este método teve origem no Japão, a fim de melhorar a qualidade do peixe para o sushi e, atualmente, a sua prática é generalizada. Consiste na inserção rápida e direta de um espigão (ponta de uma faca afiada ou ferramentas específicas para o efeito, que se encontram disponíveis no mercado – figura 6) no rombencéfalo, localizado ligeiramente acima da linha média que une os olhos (RSPCA 2004). Tal como o abate por percussão, o *iki jime* (*iki jimi* ou *ike jime*) é um dos métodos mais rápidos que reduz, de forma significativa, o stress (Boyd et al. 1984; Poli et al. 2005). É sobretudo utilizado para manter a qualidade (Davie and Kopf 2006). Aplicado com precisão resulta na destruição do cérebro, o que inibe a ação reflexiva e como tal os movimentos musculares estão ausentes, o que se traduz numa melhor qualidade em comparação com todos os outros métodos (Boyd et al. 1984; Poli et al. 2005; Davie and Kopf 2006). No entanto, o cérebro dos peixes não é uma estrutura de grandes dimensões, pelo que é necessário grande destreza e conhecimento anatómico, assim como uma

contenção efetiva (Lambooij et al. 2002; Poli et al. 2005). Por conseguinte, é recomendado uma insensibilização prévia, de modo a garantir a fácil contenção dos peixes (Davie and Kopf 2006).

Existe uma aplicação, *IkiJime Tool Lite*, que fornece diagramas que identificam a localização exata do cérebro de mais de 140 espécies de peixes, para que tanto o setor da aquacultura como o da pesca tradicional comecem a adotar esta prática ética (Ikigun 2019). O *iki jime* apresenta uma crescente adesão, sobretudo na indústria da produção de atum e savelha (Ikigun 2019).



**Figura 6 – Dispositivo para o abate de peixes através do método *Iki jime*, e respetivo dispositivo para contenção efetiva. Fonte: <https://www.ikigun.com/>**

### 5.2.3. Tiro

Este método pode ser efetuado através do uso de armas de fogo ou arco e flecha, que penetram em órgãos vitais ou no cérebro. Originalmente, na pesca submarina os pescadores tradicionais utilizavam bastões afiados ou varas com pontas de lanças feitas com conchas, pedras ou ossos, ou então arco e flecha (Barton et al. 2009). Por vezes os grandes atuns são capturados e puxados para a superfície, sendo então baleados na cabeça com recurso a espingardas ou revólveres (Robb and Kestin 2002). Se o tiro for preciso, pode resultar em morte imediata, com o mínimo stress. Por esta razão, o método foi desenvolvido para o abate de peixes de alto valor, de forma a evitar danos e stress durante tentativas de fuga (Robb and Kestin 2002). Contudo, se não for bem efetuado, e a morte não for imediata, o bem-estar animal fica comprometido (Diggles et al. 2011).

#### **5.2.4. Decapitação / luxação cervical/ secção medular**

Através destes métodos ocorre a separação da cabeça do corpo (decapitação), quebra das vertebra cervicais (luxação cervical) ou secção da medula espinhal, idealmente com uma incisão feita através de um dos opérculos com recurso a um instrumento afiado (faca). Estes métodos provocam morte imediata. Contudo, para algumas espécies de peixes a luxação cervical, pode não provocar inconsciência imediata (Diggles and Landos 2012). Por conseguinte, é recomendado que, a luxação cervical, seja acompanhada por método complementar, de forma a promover a inconsciência do peixe (Davie and Kopf 2006). Enquanto que através da secção medular, a medula espinhal ao ser destruída promove insensibilização imediata e os movimentos reflexivos cessam. Este é considerado um dos métodos que provoca mais rápida insensibilização nos peixes e que mantém os padrões de qualidade do peixe (Pedrazzani et al. 2007), sem alterações significativas em relação aos métodos mais tradicionais, como a termonarcose (Pedrazzani et al. 2007).

#### **5.2.5 Sangria**

A sangria é comumente praticada no abate de peixes, a fim de maximizar a qualidade do produto final (Southgate and Wall 2001; Robb and Kestin 2002). É geralmente realizada após insensibilização (Southgate and Wall 2001), no entanto, também é usada sem insensibilização prévia (Robb and Kestin 2002). A sangria pode ser efetuada através do corte ou remoção das brânquias ou pelo corte da veia caudal, com posterior colocação do peixe em água para sangrar (Robb and Kestin 2002). O abate por sangria sem insensibilização prévia é um procedimento relativamente lento, em que os peixes exibem não só reações adversas como tentativas vigorosas de fuga e abertura ampla da boca e brânquias, mas também respostas a estímulos durante um longo período de tempo (Morzel et al. 2002). A sangria é mais eficaz quando aplicada a peixes ativos, que requerem altas concentrações de oxigénio, como as das famílias *Scombridae* e *Salmonidae* (Davie and Kopf 2006). Peixes menos ativos, como o bagre (*Ictaluridae*), podem sobreviver a longos períodos de deficiente fluxo sanguíneo para o cérebro (Davie and Kopf 2006). De acordo com o Painel Científico da Saúde e Bem-Estar Animal da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, a sangria sem insensibilização prévia não é um método ético, pelo que não deve ser praticada (van de Vis et al. 2003).

**Tabela 5 - Período de tempo necessário para a insensibilização ser alcançada por sangria, em diferentes espécies de peixes.**

<b>Espécie de peixe</b>	<b>Insensibilização</b>
Salmão do Atlântico	Perda da função cerebral 4,5 min após o corte das brânquias (Robb et al. 2000b); 10-15 minutos após sangria por corte das brânquias, e colocação em água a uma temperatura inferior à do habitat do peixe (Erikson et al.1999).
Pregado	Após sangria pelo corte dos arcos branquiais e posterior colocação na água a 16°C, foram observadas respostas a estímulos externos aos 30 minutos (Morzel et al.2002). O corte da veia caudal com posterior colocação do peixe em água a uma temperatura de 16°C é um método ainda menos eficaz, nenhum peixe foi morto ou insensibilizado em 90 minutos (Morzel et al. 2002).
Bagre	Resposta a estímulos nocivos por um período mínimo de 15 minutos, após o corte das brânquias (Lambooi et al. 2003).

### **5.3. Outros métodos**

#### **5.3.1. Eletronarcose/eletrocussão**

Através da gestão dos parâmetros elétricos (tensão, frequência e duração), o uso da corrente elétrica pode ter duas finalidades: a insensibilização, conhecida por eletronarcose; ou a morte, conhecida por eletrocussão. A passagem da corrente elétrica pelo corpo do animal estimula todas as regiões do cérebro, com consequente ataque epileptiforme generalizado, deste modo, o animal torna-se incapaz de responder aos estímulos nervosos (Kooi et al. 1978). A eletrocussão é irreversível, destrói completamente a função cerebral e, portanto, torna o animal inconsciente, com supressão do reflexo respiratório (HSA 2014). Enquanto que a eletronarcose é reversível, em que a função cerebral normal é interrompida apenas por um curto período de tempo, pelo que deve ser seguido de um método de abate, antes que o animal possa recuperar a consciência. É um método que minimiza o stress dos peixes no momento do abate, visto que provoca inconsciência imediata, para além de que, a manipulação pré-abate é reduzida ou eliminada, sem necessidade de remoção da água (EFSA 2004; Robb and Roth, 2003; Lambooi et al. 2008; Knowles et al. 2008; Lines et al. 2003). No entanto, a qualidade do peixe pode ser comprometida devido à possibilidade da rutura de vasos sanguíneos dos tecidos musculares, em resposta ao forte estímulo elétrico (Digre et al. 2010). De forma a evitar possíveis hemorragias, deve haver especial atenção ao ajuste de parâmetros como o tipo de corrente (CA - alternada, CC - contínua), a frequência

da corrente, a intensidade da corrente elétrica e o tempo de exposição (Roth et al. 2004; Lines and Kestin 2005). Quando o tempo de exposição da corrente elétrica é muito prolongado, a qualidade do músculo também é afetada negativamente, devido à intensa glicólise anaeróbia associada ao stress (Kiessling et al. 2004), com consequente estabelecimento precoce do *rigor mortis* (Jerrett and Holland, 1998).

Existem duas abordagens para a eletronarcose/eletrocussão, dentro ou fora de água, em que a corrente é aplicada ao corpo inteiro do peixe. A eletronarcose na água é usada em peixes como a truta arco-íris (Lines and Spence 2014; EFSA 2009b) e a carpa (EFSA 2009c). No caso da truta arco-íris, o campo elétrico é gerado através de dois elétrodos de placa numa tina com água (EFSA 2009b), enquanto que na carpa os dois elétrodos de placa cobrem toda a área das duas paredes opostas de uma tina com água (EFSA 2009d). No caso do salmão do Atlântico, o peixe é retirado da água, e colocado numa correia transportadora com elétrodos negativos e positivos (EFSA 2009a). Em comparação com outros métodos atordoamento e abate, a eletronarcose/eletrocussão parece ser uma alternativa mais ética e eficiente, contudo, se os sistemas elétricos não forem aplicados corretamente podem comprometer o bem-estar animal (EFSA 2004).

### **5.3.2. Narcose por dióxido de carbono**

É um método muito utilizado, devido à facilidade de dissolução do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na água, onde é gerado um ambiente ácido e hipóxico, com consequente insensibilização (Conlee et al. 2005). À medida que a dissolução ocorre o pH começa a diminuir. Os peixes são removidos da água saturada com dióxido de carbono aquando da ausência de movimento, após cerca de 2-3 minutos (EFSA, 2004). Imediatamente após serem removidos são sangrados, para garantir a perda total de consciência (Erikson 2011). Kestin et al. (1995) relataram que, durante o período inicial de narcose, os peixes exibem um comportamento muito aversivo por um período de, aproximadamente, 30 segundos. Para além destas respostas comportamentais, alguns peixes como a truta arco-íris, carpas e enguias também aumentam a produção de muco, um possível sinal de stress (Conte 2004). Por esta razão, este método foi proibido em alguns países. Contudo, a narcose por CO<sub>2</sub> é utilizada para abates comerciais de peixes como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (EFSA 2009b).

A narcose por CO<sub>2</sub> em água gelada é um método de 2 fases em que os peixes inicialmente são colocados em água a 1°C para reduzir a resposta hiperativa e depois são colocados em água saturada com dióxido de carbono (Roth et al. 2006). Este método pode ser considerado como uma prática mais ética de induzir o estado de hipercapnia em peixes

(Erikson et al. 2006). No entanto, as baixas temperaturas podem retardar o início da insensibilização, o que pode prolongar os efeitos negativos do CO<sub>2</sub> (Robb and Roth 2003).

Devem ser feitas pesquisas sobre a utilização de gases menos aversivos, de forma a melhorar o bem-estar dos peixes no abate. Tem sido estudado o efeito da narcose por monóxido de carbono (CO), contudo, o salmão do Atlântico (*S. salar*) em imersão de água saturada por CO demonstrou comportamentos como natação errática, convulsões e movimentos circulares próximos à superfície durante 8 a 10 minutos (Concollato et al. 2014). Também foi investigado o uso de nitrogênio para o abate de truta arco-íris e foi possível observar que, este método de insensibilização, não provocou uma resposta comportamental tão grave, como a observada em peixes imersos em água saturada com CO<sub>2</sub> (Wills et al. 2006).

**Tabela 6 - Período de tempo necessário para insensibilização ser alcançada por dióxido de carbono, em diferentes espécies de peixes.**

<b>Espécie de peixe</b>	<b>Insensibilização</b>
Truta arco-íris	Após 4,7 minutos (Kestin et al. 1995)
Salmão do atlântico	Após 6 minutos (Robb et al. 2000b)
Enguias e esturjões	Espécies de peixes mais tolerantes à hipoxia e como podem resistir durante mais de uma hora, sendo por isso mais stressante para estas espécies (Marx et al. 1997).

### **5.3.3. Sedação pré-abate com anestésico**

A sedação reduz a resposta ao stress pré-abate em peixes, mas não os atordoa ou mata, pelo que deve ser seguida de um método de abate. Com a sedação os peixes demonstram muito menos stress no momento em que são retirados da água para o abate (AQUI-S 2019). Na Oceânia os peixes são sedados com isoeugenol antes do abate (Robb and Kestin 2002) e o anestésico AQUI-S é usado no abate de salmão em países como o Chile, Austrália e Nova Zelândia (AQUI-S 2019). No entanto, esta prática em alguns países europeus é proibida, devido à introdução de um medicamento no organismo do animal e às implicações no mercado consumidor (Lines et al. 2003).

## **6. Abate de peixes na Europa**

### **6.1. Normas da OIE relativas ao abate de peixes**

O regulamento (CE) No. 1099/2009 do Conselho de 24 de setembro de 2009 refere-se à proteção dos animais no momento do abate, contudo não inclui recomendações relativas aos peixes de aquacultura. Para contornar esta ausência de recomendações, a OIE emitiu um capítulo relacionado com esta temática, no código sanitário para os animais aquáticos (OIE, 2012). O capítulo 7.3 do código descreve os princípios gerais que devem ser aplicados de forma a assegurar o bem-estar dos peixes durante a etapa do abate:

- como princípio geral, os peixes devem ser atordoados antes de serem abatidos, e deve ser garantida a perda imediata e irreversível da consciência;
- a escolha do método deve ter em consideração as características específicas da espécie;
- devem ser utilizados métodos mecânicos ou elétricos;
- todos os equipamentos de insensibilização e abate devem ser mantidos e utilizados de forma adequada, assim como testados de forma regular;
- a insensibilização efetiva deve ser verificada pela ausência de consciência;
- qualquer peixe mal insensibilizado ou a recuperar da consciência antes da morte, deve ser insensibilizado assim que possível;
- para a eletroanestesia é essencial conhecer a intensidade e duração da corrente elétrica, assim como frequência adequada;
- métodos que prejudicam o bem-estar dos peixes, como a asfixia por exposição ao ar, CO<sub>2</sub>, termonarcose, sangria sem insensibilização prévia, não devem ser utilizados. Se viável, recorrer ao abate mecânico ou elétrico.

### **6.2. Panorâmica geral do abate de peixes nos países da EEE**

Através do Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho (COM,2018), sobre a possibilidade de introduzir certos requisitos no que se refere à proteção dos peixes no momento do abate, é possível ter uma perceção da situação atual da aquacultura. O relatório fornece uma panorâmica geral das legislações e orientações nacionais/normas privadas que regulam aspetos de bem-estar relativos ao abate (anexo 1), assim como uma panorâmica geral da adesão às normas da OIE.



**Tabela 7 - Métodos de atordoamento e abate utilizados nas principais espécies de peixes produzidas nos países da EEE (Adaptado de COM, 2018).**

	País	Métodos de atordoamento e abate
<b>Salmão-do-atlântico</b>	Noruega	Percussão, termonarcose + eletronarcose/CO <sub>2</sub>
	Reino Unido	Percussão
	Irlanda	Percussão, CO <sub>2</sub>
<b>Carpa-comum</b>	Polónia	Percussão, eletronarcose
	República Checa	Eletronarcose
	Alemanha	Percussão, eletronarcose
<b>Truta-arco-íris</b>	Dinamarca	Eletronarcose
	França	Percussão, CO <sub>2</sub> , termonarcose + eletronarcose
	Itália	Eletronarcose
	Polónia	Termonarcose
<b>Robalo</b>	Grécia	Termonarcose
	Espanha	Termonarcose
	Itália	Termonarcose
<b>Dourada</b>	Espanha	Termonarcose

No que se refere à produção de Salmão do Atlântico, o Reino Unido cumpre as normas da OIE, uma vez que utiliza como método de abate a percussão, enquanto a Noruega e a Irlanda cumprem parcialmente as normas. Na Noruega, para além do método principal ser a percussão (normas cumpridas), é utilizada a eletronarcose em que é frequente a orientação incorreta dos peixes, assim como o recurso a CO<sub>2</sub>, em que as normas não são respeitadas. Na Irlanda, para além do abate por percussão também se recorre à utilização de CO<sub>2</sub>.

Quanto à produção de Carpa Comum, na Polónia, Republica Checa e Alemanha as normas da OIE são parcialmente cumpridas. Na Polónia e na Alemanha, os métodos mais frequentes são a percussão manual e a eletronarcose, contudo, não existem dados suficientes acerca da eficácia do equipamento, tal como acontece na República Checa.

Na produção de Truta-arco-iris, a Itália, a Dinamarca e a França cumprem parcialmente as normas da OIE. Na Polónia as normas não são cumpridas, uma vez que utiliza o método de abate por termonarcose. Na Itália e Dinamarca o abate é por eletronarcose, com poucos dados relativos ao equipamento, o que levanta dúvidas sobre se as normas são cumpridas ou não. Na Dinamarca também é praticada a termonarcose, que não satisfaz as normas. Na França o abate é por percussão, que cumpre as normas, no entanto, o recurso à termonarcose associado à eletronarcose não cumpre as normas.

Quanto ao abate de robalo e dourada, na Itália, na Grécia e em Espanha as normas da OIE não são cumpridas, pelo facto de o método de abate praticado ser a termonarcose.

## II – VISÃO INTEGRADA DOS EFEITOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE ATORDOAMENTO E ABATE NA CORVINA (*ARGYROSOMUS REGIUS*)

### 1.Introdução

De acordo com a Organização Alimentar e Agrícola das Nações Unidas, a aquacultura representa o setor de produção alimentar com o crescimento mais rápido a nível mundial (FAO 2013). Mais de 93,5 milhões de toneladas de pescado foram produzidos em 2011, o setor continuou a crescer e alcançou uma produção de pescado de 172,6 milhões de toneladas em 2017 (FAO, 2019).

Um dos pontos críticos na gestão da piscicultura é a etapa do abate, por induzir stress nos animais e, por sua vez, afetar tanto o bem-estar animal como a qualidade do peixe (Southgate and Wall 2001). Apesar de os peixes serem animais dotados de sensibilidade, estes não estão abrangidos pelo regulamento relativo à proteção dos animais no momento do abate (Regulamento CE n.º 1099/2009). Como tal, a etapa do abate de peixes acaba por ser negligenciada, ao ter pouca ou nenhuma consideração pelo bem-estar animal. O abate de peixes deve ser efetuado com ética, com perda imediata e irreversível da consciência e sensibilidade, e caso não assegure estas condições deve existir uma insensibilização prévia (OIE 2012). Como a resposta ao abate varia consoante fatores como a espécie de peixe, há necessidade de mais pareceres científicos, sobretudo no que se refere à influência dos diferentes métodos de atordoamento e abate, quer no bem-estar animal, quer na qualidade do peixe, de forma a conhecer qual a melhor prática para determinada espécie de peixe.

O presente estudo tem como objetivo fornecer uma visão integrada dos efeitos de diferentes métodos de atordoamento e abate na corvina (*Argyrosomus regius*), de forma a determinar qual o método que minimiza o stress *ante mortem* e maximiza a qualidade. A corvina (*Argyrosomus regius*) é um peixe teleósteo da família *Sciaenidae*, com crescente utilização na aquacultura, principalmente nos países europeus (FAO 2010). Os métodos de atordoamento e abate estudados foram a termonarcose, a secção medular, a eletronarcose e o *iki jime*, que também são comparados ao método praticado na pesca tradicional, asfixia por exposição ao ar.

Para quantificar a gravidade de um risco de bem-estar em animais terrestres são avaliados uma série de indicadores comportamentais e fisiológicos associados ao stress e à dor (Broom 1991; Webster 2001), que também são verificáveis entre peixes (Bonga 1997; Barton 2002). Como tal, a avaliação do bem-estar animal inerente a cada método de abate requer o estudo destes indicadores. São muitas as mudanças fisiológicas envolvidas na resposta ao stress, sendo que uma das respostas primárias mais aceites é o aumento do cortisol plasmático (Barton 2002). Além das considerações éticas, existem também razões

económicas e comerciais para a prática de abates com ética, visto que esta etapa interfere na qualidade (Huntingford et al. 2006) ao influenciar a degradação do músculo *post mortem* e, por sua vez, o desenvolvimento do *rigor mortis* e deterioração do peixe (Lowe et al. 1993). O presente estudo é então dividido em duas componentes, o bem-estar animal e a qualidade. Para a avaliação do bem-estar animal, procedeu-se à avaliação da insensibilização e da resposta fisiológica ao stress inerente a cada método. A avaliação da insensibilização reflete o estudo de parâmetros comportamentais como os comportamentos espontâneos e os reflexos clínicos, enquanto que, na avaliação da resposta fisiológica ao stress são estudadas as concentrações plasmáticas dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais). Quanto à componente qualidade, procedeu-se à avaliação da evolução do músculo *post mortem* através do estado e índice de rigor e à avaliação sensorial do grau de frescura através de um esquema QIM (adaptado de Teixeira et al. 2009; Nunes et al. 2007).

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Estação Piloto de Piscicultura de Olhão**

A Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) caracteriza-se por ser uma infraestrutura única no país concebida para a realização de investigações, desenvolvimento e demonstração experimental, com o objetivo de contribuir para o crescimento do setor. A estação pertence ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) e localiza-se no Parque Natural da Ria Formosa. É constituída por uma zona de maternidade, pré-engorda e engorda (tanques de terra, em sistema de monocultura, policultura ou multitrófico), onde se realizam vários ensaios e estudos, com destaque para a dourada, o robalo e, mais recentemente, também em espécies como o sargo, o mero, o linguado e a corvina. De notar que o peixe produzido pode ter como destino instituições de beneficência, visto que são respeitadas as regras da qualidade e segurança dos alimentos.

### **2.2. Corvina (*Argyrosomus regius*)**

A corvina é um peixe teleósteo (González-Quirós et al. 2011), pertencente à família *Sciaenidae* (Lagardère and Mariani 2006) (tabela 8). É considerada um dos maiores cienídeos (Prista et al. 2009), ao alcançar até dois metros comprimento e 50 a 100 kg de peso (FAO 2010; Castaldo 2012). Apresenta um crescimento rápido (pode atingir 2,5 kg em dois anos) e um índice de conversão de 0,9-1,2. (FAO 2010). Caracteriza-se por ter uma cabeça relativamente grande, corpo alongado, de coloração cinzenta escura com sombras prateadas (zona ventral) e tonalidade bronze (laterais) (Castaldo 2012) e a cavidade bucal apresenta uma coloração alaranjada (Cárdenas 2010) (Figura 7).



**Figura 7 – Corvina, *Argyrosomus regius*. Fonte: [www.ipma.pt](http://www.ipma.pt).**

A temperatura mais favorável para o crescimento da corvina varia entre os 17 e os 21°C (Cárdenas 2010), no entanto, é uma espécie euritérmica (Cárdenas 2010), que resiste bem à variação de temperatura entre 2 e 38°C (Ferreira 2017) e de salinidade entre 5 e 42‰ (Peixoto et al. 2017). É um peixe com baixo teor de gordura, alto teor de proteína, ómega 3 e vitamina D, e fornece uma quantidade considerável de niacina, vitamina B6, potássio e fósforo (Docapesca 2017). A principal área de distribuição geográfica da corvina estende-se ao longo do Atlântico Nordeste e Centro - Este, entre o Senegal e o Norte de França, no Mar Mediterrâneo e Mar Negro (Haffray et al. 2012; FAO, 2012). Como é um peixe muito apreciado nos países do sul da Europa existe um défice que é suplementado com importações provenientes de Marrocos (FAO 2010). A corvina apresenta um grande potencial para a aquacultura mediterrânica (FAO 2010).

**Tabela 8 - Classificação taxonómica da corvina, (*Argyrosomus regius*) (Chao 1986).**

Reino	Filo	Ordem	Família	Género	Espécie
<i>Animalia</i>	<i>Cordata</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Sciaenidae</i>	<i>Argyrosomus</i>	<i>A. regius</i>

### 2.3. Captura

Um conjunto de 36 corvinas (*Argyrosomus regius*) com uma média de peso corporal de 630 g e comprimento de 41 cm foi obtido na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO). Os exemplares eram juvenis, com cerca de um ano e meio, de tamanhos aproximados e alimentados da mesma forma, a fim de procurar a máxima harmonia de características e evitar que, fatores como a idade, tamanho e alimentação, pudessem interferir na interpretação dos resultados.

No dia do abate, os peixes foram capturados manualmente através da colocação de uma rede de mergulho/imersão nos tanques de terra (figura 8), em que um dos lados afunda, pelo peso de chumbos, e o lado oposto flutua devido à presença de bóias. Trata-se de um procedimento vagaroso e delicado de forma a evitar comprometer o bem-estar animal. Os peixes encontravam-se em jejum há 24 horas.

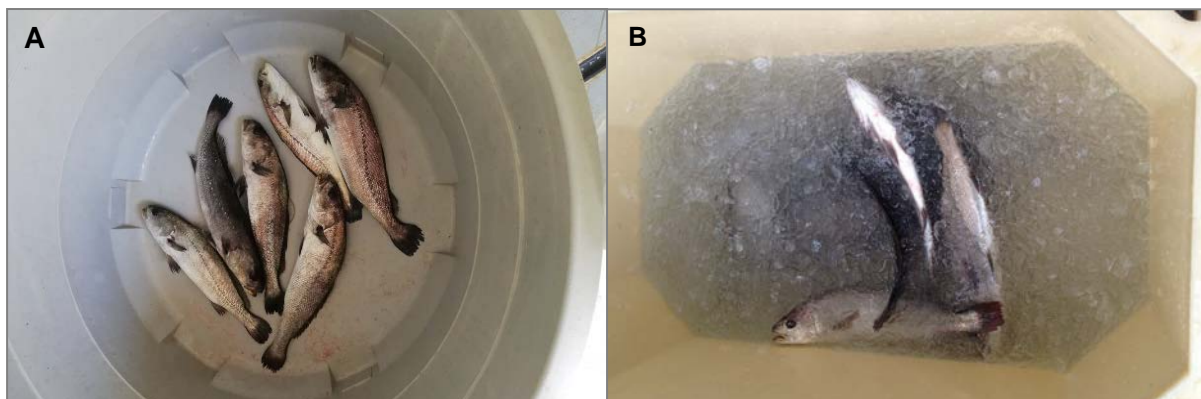


**Figura 8 - Tanques de terra da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), onde foram capturadas as corvinas (*Argyrosomus regius*) para o estudo dos efeitos de diferentes métodos de atordoamento e abate (asfixia por exposição ao ar, termonarcose, eletronarcose, secção medular e *iki jime* (foto original).**

Após a conclusão do cerco a rede foi manipulada de forma vagarosa, a fim de concentrar os peixes ainda na zona submersa, de onde foram recolhidos com um chalavar (camaroeiro) e colocados numa tina (500 L) com água da ria de Formosa a 11 ° C. A tina tinha um sistema de fluxo contínuo com os níveis de oxigénio a  $78 \pm 3,4\%$  e o pH da água a  $6,5 \pm 0,3$ . A operação foi realizada em segundos para minimizar a exposição ao ar. Após a captura, a tina com os peixes foi transportada a uma distância de ~ 300 m, com auxílio de um trator, para próximo das instalações onde foram manipulados para o respetivo método de abate. Ao contrário da amostragem biométrica os animais são necessariamente sacrificados e, por este motivo, o número de indivíduos analisados é sempre muito menor, a avaliação foi feita com 6 peixes em cada método de abate.

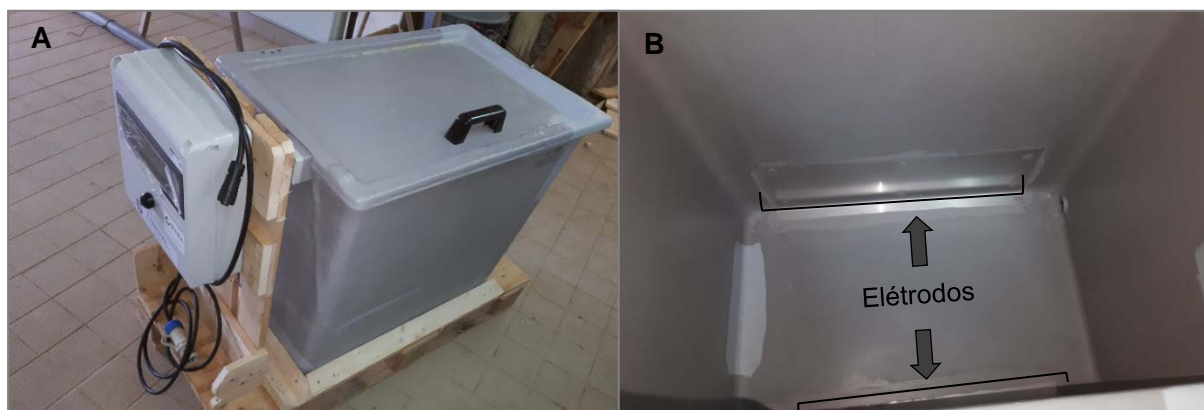
## **2.4. Métodos de atordoamento e abate**

Foram estudados cinco métodos de atordoamento e abate: termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ), eletronarcose (grupo EL) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF, de forma a simular a prática de abate na pesca tradicional). No abate por asfixia por exposição ao ar, os peixes foram colocados numa tina sem água, apenas com exposição ao ar à temperatura ambiente (21°C) (figura 9A). No método por termonarcose, os peixes foram imersos numa tina em que a relação água/gelo era de 1:1 a 2-4 °C (figura 9B);



**Figura 9 – Abate de corvinas (*Argyrosomus regius*) por exposição ao ar à temperatura ambiente (21°C) (A); Abate de corvinas (*Argyrosomus regius*) por imersão numa tina com água e gelo na proporção de 1:1 a 2-4°C (B) (fotos originais).**

No método por eletronarcose, os peixes foram colocados numa tina com água onde era gerado um campo elétrico através de dois elétrodos de placa, colocados nas paredes opostas da tina (figura 10). Foram testados diferentes tempos de exposição (5s, 10s e 15s) a uma corrente elétrica cuja diferença de potencial era 24V, de forma a encontrar qual a melhor combinação para induzir insensibilização total.

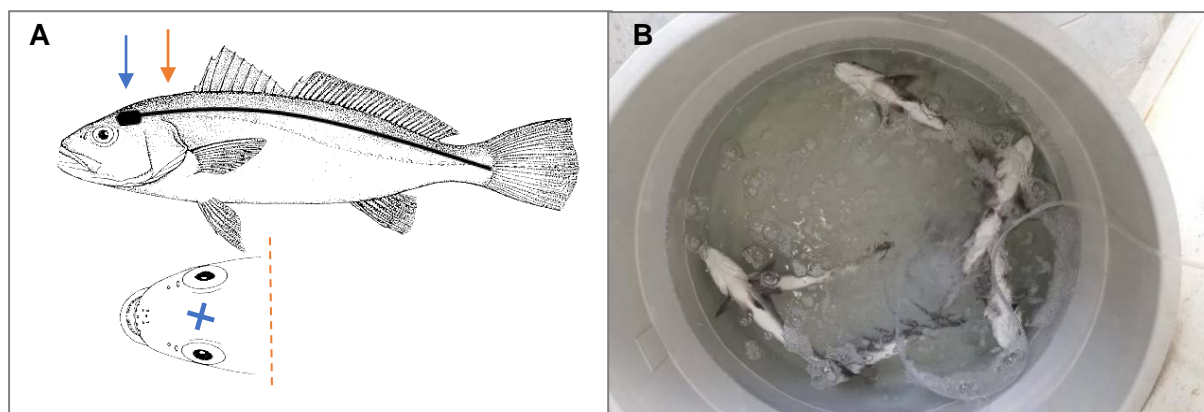


**Figura 10 – Equipamento para o abate de peixes por eletronarcose (A). É gerado um campo elétrico através de dois elétrodos de placa colocados nas paredes opostas da tina (B) (fotos originais).**

No abate por secção medular foi realizada uma incisão, na medula espinhal na zona das vértebras cervicais, com recurso a um instrumento afiado (faca) (figura 11A, assinalado a laranja). No abate por *iki jime* foi realizado um procedimento que requer mais precisão, uma inserção rápida e direta, com a ponta de uma faca afiada (idealmente com ferramentas específicas para o efeito, que se encontram disponíveis no mercado) de forma a atingir o



romboencéfalo que, de forma geral, está localizado ligeiramente acima da linha média que une os olhos (RSPCA 2004) (figura 11A, assinalado a azul).



**Figura 11 – Local de incisão para o abate de corvinas (*Argyrosomus regius*) por secção medular (laranja) e o ponto de referência para o abate por *iki jime* (azul) (A). Anestesia de peixes com diluição de 22,5mL de fenoxietanol numa tina com 300 L de água (B). (imagem A adaptada de: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus\\_regius/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en); imagem B foto original).**

Foi utilizado um grupo de peixes em repouso como grupo controlo na avaliação da resposta fisiológica ao stress. A manipulação inerente ao procedimento de recolha sangue podia influenciar os resultados da resposta ao stress, como tal, neste grupo recorreu-se à anestesia de forma a induzir a perda de sensibilidade. Foi diluído 22,5mL do anestésico fenoxietanol numa tina com 300L de água (com sistema de fluxo de oxigénio contínuo) onde se encontravam os peixes (figura 11B).

**Tabela 9 – Síntese dos métodos de atordoamento e abate da corvina (*Argyrosomus regius*), para posterior visão integrada dos seus efeitos.**

Grupo	Descrição	Método de abate
AF	Peixes colocados numa tina e expostos ao ar à temperatura ambiente (21°C).	Asfixia por exposição ao ar
TN	Peixes colocados numa tina com água/gelo (1:1) a 2-4°C.	Termonarcose
EL	Peixes colocados numa tina com água onde é gerado um campo elétrico.	Eletronarcose
SM	Incisão na zona das vértebras cervicais com o auxílio de um instrumento afiado.	Secção medular
IJ	Inserção rápida e direta de um instrumento afiado, acima da linha média que une os olhos do peixe.	<i>iki jime</i>

## 2.5. Bem-estar animal

### 2.5.1. Avaliação da insensibilização

Com base na neuroanatomia, neurofarmacologia e respostas comportamentais, há evidências de que os peixes são dotados de sensibilidade (Volpato 2009). A avaliação da insensibilização inerente a cada método de abate torna-se importante, de forma a determinar qual a rapidez de indução da insensibilidade (Kestin et al. 2002), e assim sejam escolhidos os métodos que assegurem o mínimo stress possível.

Para a avaliação da insensibilização foi utilizado um protocolo adaptado de Kestin et al. (2002), em que foram observados os comportamentos espontâneos (natação e movimento opercular) e reflexos clínicos (equilíbrio e reflexo vestibulo-ocular) dos peixes imediatamente após a aplicação de cada método de abate (considerado o tempo zero) (tabela 10). O período de persistência de manifestação de cada parâmetro comportamental foi cronometrado até à evidência da insensibilização, que ocorre aquando da ausência de todos estes parâmetros.

**Tabela 10 – Parâmetros comportamentais para a avaliação da insensibilização na corvina (*Argyrosomus regius*), após o início da aplicação diferentes métodos de atordoamento e abate (asfixia por exposição ao ar, termonarcose, eletronarcose, secção medular e *iki jime*).**

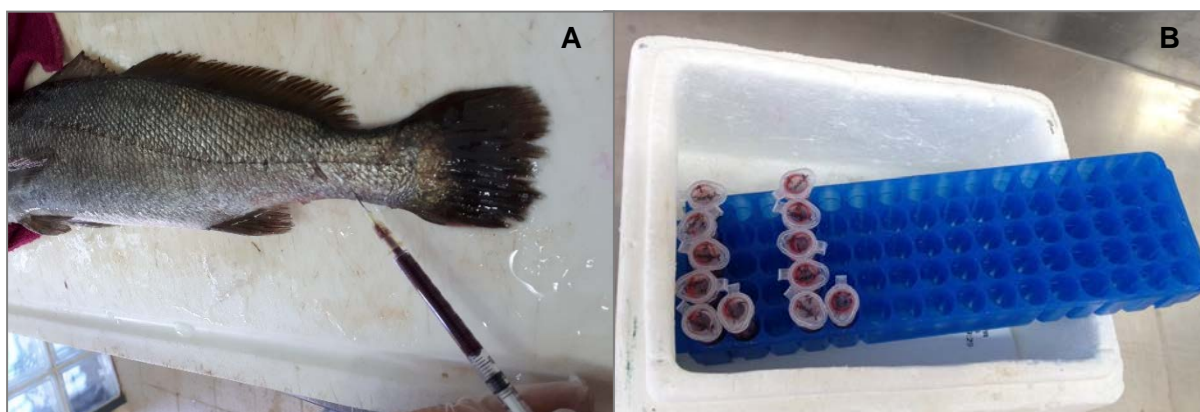
Comportamentos espontâneos	Reflexos clínicos
1.Comportamento de natação	2.Equilíbrio
3.Movimento opercular	4.Reflexo vestibulo-ocular

Os parâmetros comportamentais foram avaliados consoante a ordem indicada na tabela 10. A avaliação do comportamento de natação, movimento opercular e equilíbrio foi realizada com os peixes dentro de uma tina com água. O equilíbrio foi avaliado através da inversão da posição fisiológica do peixe, com o objetivo de observar o retorno à posição inicial. Para a avaliação do reflexo vestibulo-ocular os peixes encontravam-se fora de água. Este reflexo foi avaliado através do movimento lateral da cabeça, de forma a observar a presença ou ausência do acompanhamento do movimento ocular. O tempo decorrido até à insensibilização foi registado para cada método de abate.



### 2.5.2. Avaliação da resposta fisiológica ao stress

Após a insensibilização total/morte foram recolhidas amostras de sangue para avaliação da resposta fisiológica ao stress, através das concentrações plasmáticas de cortisol, glucose, lactato e proteínas totais. A colheita de sangue foi realizada com punção da veia caudal, de forma a colher cerca de 1mL de sangue em tubos “eppendorf” com heparina (figura 12).



**Figura 12 - Colheita de sangue na corvina (*Argyrosomus regius*) através da punção da veia caudal (A), e introdução em tubos “eppendorf” (B), para posterior avaliação das concentrações plasmáticas dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais).**

As amostras de sangue foram centrifugadas, durante 5 min a 4000 r.p.m. para obter o plasma. De seguida, o plasma foi transferido para um novo tubo “eppendorf”, por meio de uma pipeta, e armazenado a -20°C para posterior determinação dos níveis plasmáticos de cortisol, glucose, lactato e proteínas totais. As concentrações plasmáticas de cortisol plasmático (ng/mL) foram determinadas através do kit comercial “cortisol saliva ELISA”, um sistema enzimático baseado no princípio de competição, para determinação quantitativa do cortisol no soro ou no plasma, com leitura de absorvância a 505 nm. Uma quantidade indeterminada de antigénio presente na amostra e uma quantidade fixa de antigénio, marcado com enzima, competem pelos locais de ligação dos anticorpos que revestem os poços. Depois da incubação, os poços foram lavados para interromper a reação de competição. Após a reação do substrato, a intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade de antigénio na amostra, e os resultados foram determinados diretamente através da curva padrão (IBL). A glucose plasmática (mg/dl) e o lactato plasmático (mg/dl) foram determinados por análise colorimétrica enzimática em placas de ELISA, para o que se usaram os “kits” comerciais “Kit QCA” e “Kit Spinreact”, respetivamente, com leitura de absorvância 505 nm. Para a determinação das proteínas totais plasmáticas (mg/dL) também foi usado o “Kit Spinreact”, com leitura de absorvância a 540 nm.

## 2.6. Qualidade do peixe

Após a colheita de sangue os peixes foram numerados e procedeu-se ao registo individual do peso, comprimento do corpo (figura 13) e da primeira medição do comprimento da inclinação da cauda para o cálculo do índice de rigor (IR). Logo de seguida foram colocados em caixas de poliestireno, cobertas com gelo (1:1) (figura13) e armazenados numa câmara frigorífica (+ 2 °), para posteriores avaliações no decorrer de 52h *post mortem*. Após cada tempo de amostragem, os peixes foram novamente colocados nas mesmas condições de armazenamento. Os peixes do grupo controlo foram colocados em aquários de 10L para recuperação.



**Figura 13 – Pesagem e medição do comprimento do corpo de corvinas (*Argyrosomus regius*), seguida de colocação em caixas de poliestireno cobertas com gelo (1:1) (fotos originais).**

### 2.6.1. Avaliação da evolução do músculo *post mortem*

Logo após a morte do peixe dá-se início a um processo de transformação no músculo, que culmina na putrefação, onde é possível distinguir-se três fases: pré-rigor, *rigor mortis*, pós-rigor/resolução do rigor (Sainclivier 1983). Para o estudo da evolução do músculo *post mortem* procedeu-se à avaliação do estado de rigor e determinação do IR. A amostragem foi realizada às 0, 5, 22, 29, 46 e 52h *post mortem*.

#### 2.6.1.1. Estado de rigor

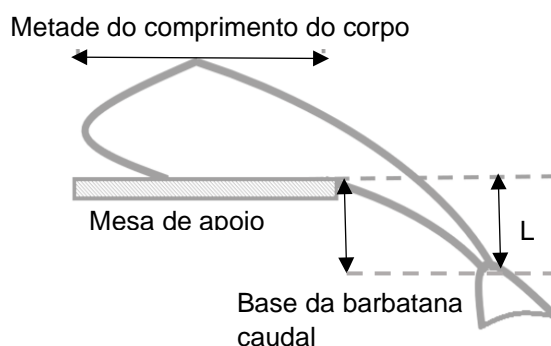
O estado de rigor foi avaliado com base na rigidez dos peixes, através do toque e observação visual. Aos peixes foi atribuído um valor de 0 a 5, em que o limite mínimo (0) corresponde à ausência de rigor e o limite máximo corresponde a um estado de rigor muito forte (Curran et al. 1986): 0 = pré ou pós-rigor; 1 = início de rigor (primeiro sinal de rigidez, por exemplo na região do pescoço ou cauda); 2 = rigor (área maior em rigor); 3 = área total em rigor; 4 = rigor mais forte; 5 = rigor muito forte (peixe extremamente rígido e em forma de bastão) (Erikson 2001). No tempo de amostragem 0h, imediatamente após a morte, o estado de rigor corresponde ao limite mínimo (zero), em todos os grupos.

### 2.6.1.2. Índice de rigor

Para avaliar a evolução do músculo *post mortem* também foi determinado o Índice de rigor (IR), através do registo de medidas baseadas na curvatura da cauda (Bito et al. 1983). Os peixes foram colocados, individualmente, numa superfície plana e apoiados até ao início da barbatana anal, com a região caudal desprovida de apoio (figura 14). E, assim, foi medido o comprimento da inclinação da cauda, em relação à superfície plana, com o auxílio de régua e esquadro. A calibração da medição foi feita com a aproximação de 0,1 mm. O índice de rigor foi calculado, de acordo com Bito et al. 1983, através da fórmula:

$$IR = 100 * (L_0 - L_t) / L_0,$$

em que  $L_0$  e  $L_t$  correspondem à distância vertical entre a superfície da mesa e a base da barbatana caudal registada, imediatamente, após a morte e durante o armazenamento, em diferentes intervalos de tempo, ao longo de um período de 52 horas (em que  $t = 5, 22, 29, 46$  e  $52h$ ). Os peixes foram manipulados com cuidado de forma a evitar interferência no desenvolvimento do *rigor mortis*.



**Figura 14 – Diagrama da medição do comprimento da inclinação da cauda (L), para o cálculo do Índice de Rigor, onde  $IR = 100 * (L_0 - L_t) / L_0$  (Bito et al. 1983).**

### 2.6.2. Avaliação sensorial do grau de frescura

Para a avaliação sensorial do grau de frescura foi utilizado o Método do Índice de Qualidade (QIM-*Quality Index Method*), onde existe um conjunto de descritores para cada um dos parâmetros, com a respetiva pontuação, os pontos de demérito (entre 0 e 3) (Nunes and Batista 2004). O QIM tem como objetivo medir o grau ou a taxa de alteração de parâmetros como o aspeto geral, olhos e brânquias (Batista 2012). Assim, o total dos pontos de demérito, titulado por índice de qualidade (IQ), quantifica a carência da qualidade do ponto de vista sensorial (Esteves and Aníbal 2007). Desta forma, a pontuação zero corresponde aos descritores de maior frescura (Nunes and Batista 2004). O QIM varia consoante as espécies de peixes, pelo que é necessário desenvolver esquemas QIM para cada espécie de peixe. Neste estudo foi utilizado um esquema QIM adaptado para a avaliação sensorial do grau de

frescura da corvina (Anexo 2). A amostragem foi realizada às 5, 22, 29, 46 e 52h *post mortem*. Imediatamente após a morte, tempo amostragem 0h, o índice de qualidade é considerado como zero em todos os grupos.

## **2.7. Análise estatística de dados**

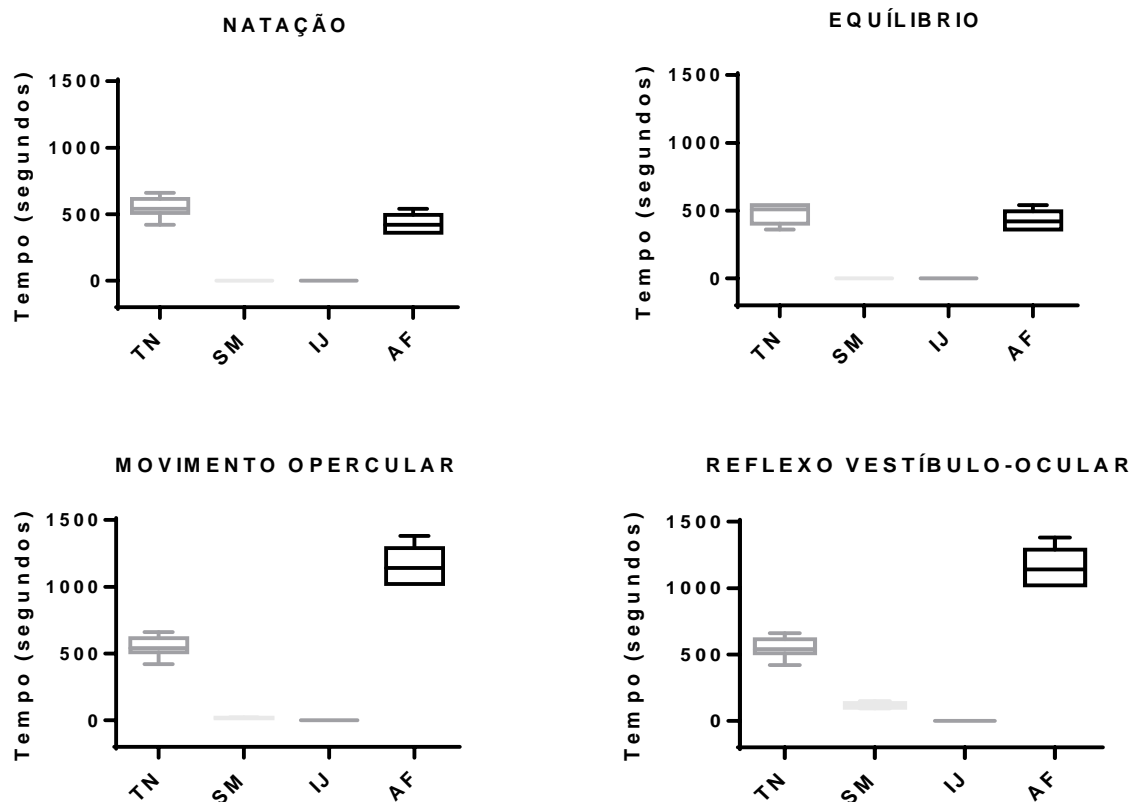
Para a análise estatística utilizou-se o programa *GraphPad Prism*, onde as variáveis são comparadas por meio da análise de variância (ANOVA). Visto que os dados não cumpriram todos os pressupostos para a realização de um teste paramétrico, foi realizado o teste estatístico Kruskal-Wallis. A interpretação dos resultados tem, contudo, deve ser cautelosa devido ao baixo número de peixes que foi possível analisar. Ao contrário da amostragem biométrica os animais são necessariamente sacrificados e, por este motivo, o número de indivíduos analisados foi muito menor. São comparadas as concentrações plasmáticas dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais) nos diferentes grupos de peixes. Na avaliação do índice de rigor foram analisados os resultados dos tempos de amostragem em relação ao tempo de amostragem anterior em cada grupo, assim como as diferenças do índice de *rigor mortis* em cada tempo em relação aos diferentes grupos. As médias são comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, e quando  $P < 0,05$  os resultados apresentam diferenças significativas. Os resultados são expressos através de média  $\pm$  desvio padrão.

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1. Bem-estar animal**

#### **3.1.1. Avaliação da insensibilização**

A avaliação da insensibilização é relevante, já que a taxa de perda de sensibilidade é um indicador importante do bem-estar animal, no que se refere aos métodos de atordoamento e abate (Kestin et al. 2002). Os parâmetros comportamentais observados estão relacionados com o comportamento espontâneo (natação e movimento opercular) e com reflexos clínicos (capacidade de manter o equilíbrio e o posicionamento dos olhos - reflexo vestibulo-ocular).



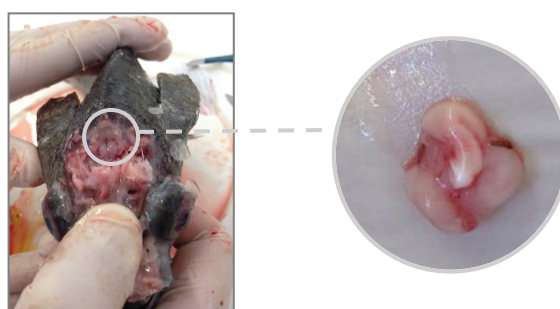
**Gráfico 1 - Período de permanência do parâmetro comportamental natação, equilíbrio, movimento opercular e reflexo vestibulo-ocular, em corvinas (*Argyrosomus regius*), imediatamente após o início da aplicação dos métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Os resultados são expressos em segundos (n = 6 em cada grupo). São representados os mínimos, máximos e as medianas.**

Após o início da aplicação de cada método de abate foi possível observar diferentes respostas comportamentais entre os grupos. No grupo AF e TN foram observadas reações aversivas, rápidas e violentas, em especial no primeiro. Segundo vários autores, o abate por asfixia por exposição ao ar é extremamente aversivo para a maioria das espécies de peixes, que demonstram comportamentos de fuga violentos, com aumento do risco de hemorragias e hematomas (Robb and Kestin 2002; Poli et al. 2005). O período de permanência do comportamento de natação e o equilíbrio foi superior no grupo TN (550 e 480s, respetivamente), já o movimento opercular e o reflexo vestibulo-ocular manifestaram-se durante mais tempo no grupo AF (1160s), com diferença significativa em relação aos outros grupos (gráfico 1).

**Tabela 11 – Período de permanência do parâmetro comportamental natação, equilíbrio, movimento opercular e reflexo vestibulo-ocular, em corvinas (*Argyrosomus regius*), imediatamente após o início da aplicação dos métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Os resultados são expressos em segundos, como médias e respetivo desvio padrão (n= 6 em cada grupo). O período de tempo necessário para a insensibilização é expresso em minutos.**

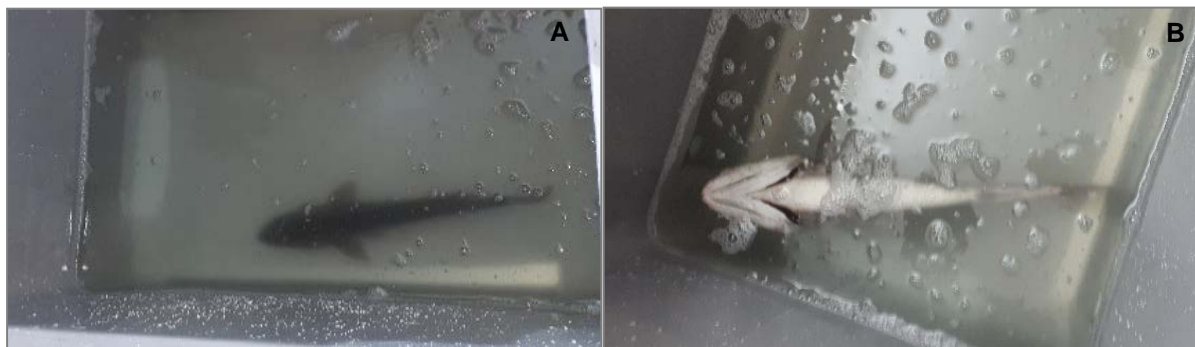
	Natação	Equilíbrio	Mov.opercular	Reflexo VO	Insensibilização
<b>TN</b>	550 $\pm$ 79,75	480 $\pm$ 75,84	550 $\pm$ 79,75	550 $\pm$ 79,75	~ 9 minutos
<b>SM</b>	0	0	17 $\pm$ 2,61	118 $\pm$ 20,66	~ 2 minutos
<b>IJ</b>	0	0	0	0	0
<b>AF</b>	430 $\pm$ 70,14	430 $\pm$ 70,14	1160 $\pm$ 140,28	1160 $\pm$ 140,2	~19 minutos

Através da tabela 11 é possível observar que, no grupo AF o comportamento de natação e equilíbrio cessaram ao fim de ~430s, e apenas ao fim de ~1160s cessaram os restantes parâmetros. No grupo TN o equilíbrio foi o primeiro parâmetro a ser perdido, aos ~480s, e após cerca de 1 minuto cessaram os restantes, aos ~550s. No grupo SM ocorreu perda imediata do comportamento natação e equilíbrio, no entanto, o movimento opercular só desapareceu ao fim de ~17s e o reflexo vestibulo-ocular aos ~118s. Já no grupo IJ ocorreu perda imediata de todos os parâmetros, o cérebro ao ser perfurado induziu insensibilização imediata (figura 15).



**Figura 15 – Dissecção de corvina (*Argyrosomus regius*). Localização do cérebro, dado como ponto de referência para o abate por *iki jime* (fotos originais).**

Como podemos observar na tabela 12, no grupo EL não foi observada insensibilização em nenhum peixe, apenas ocorreram ligeiras alterações comportamentais como a redução do comportamento de natação, a um tempo de exposição de 30s em corrente alternada (15; 15s); e a perda de equilíbrio temporária (figura 16B), a um tempo de exposição total de 20s em corrente alternada (15; 5s). Neste último foi observada uma lesão na zona bucal, o que sugere um possível contacto com a placa de eléctrodos, e daí a perda temporária de equilíbrio.



**Figura 16 – Corvina (*Argyrosomus regius*) na tina de eletronarcose antes do campo elétrico ser gerado (A). Corvina (*Argyrosomus regius*) na tina de eletronarcose imediatamente após o campo elétrico ter sido gerado (exposição total de 20s em corrente alternada (15; 5s) (B) (fotos originais).**

Neste estudo, os parâmetros elétricos do equipamento, tensão 24V (12V em cada eletrodo) e resistência 15V/A (7,5 em cada eletrodo) não demonstraram induzir a insensibilização na corvina nos tempos de exposição: 5, 10 e 15s de corrente contínua; 20, 25 e 30s de corrente alternada. Por questões éticas e problemas técnicos não foi possível repetir o teste de forma a conhecer uma combinação de parâmetros que induzisse a insensibilização por eletronarcose na espécie em estudo. Também devemos ter em consideração que, quando o tempo de exposição é muito prolongado a qualidade do músculo é prejudicada, devido à intensa glicólise anaeróbia associada ao stress (Kießling et al. 2004).

**Tabela 12 – Gestão do tipo de corrente (corrente contínua CC ou corrente alternada CA) e tempo de exposição para o abate de corvinas (*Argyrosomus regius*) por eletronarcose. (NO – não observado)**

Tipo de corrente	Tempo de exposição	Insensibilização
CC	5s	NO
CC	10s	NO
CC	15s	NO
CA	15; 5s (20s)	Perda de equilíbrio (< 3s)
CA	15; 10s (25s)	NO
CA	15; 15s (30s)	Redução do comp. de natação



O equipamento de eletronarcore utilizado não demonstrou ser o mais indicado para o abate de corvina, talvez a indução da insensibilização fosse mais eficaz em espécies de menores dimensões. Exceto no grupo EL, a insensibilização foi observada em todos os grupos, e nenhum peixe recuperou os parâmetros comportamentais, o que classifica os métodos utilizados como irreversíveis.

Os parâmetros comportamentais avaliados são indicadores robustos da função cerebral em animais (Gregory and Wotton 1983), pelo que, quando estes cessam é possível concluir que o animal está insensível/inconsciente (Anil 1991). Os movimentos operculares e o reflexo vestibulo-ocular, mediados pelo tronco cerebral, são os últimos comportamentos, respostas ou reflexos a serem perdidos (Kestin et al. 2002; Anil 1991), o que também foi possível observar neste estudo (tabela 11). O método de abate mais rápido a induzir a insensibilização foi o *iki jime* (imediate), enquanto que o mais lento foi a asfixia por exposição ao ar (~19 minutos). Este último é considerado um dos métodos de atordoamento e abate mais stressantes, em que o animal permanece consciente por longos períodos de tempo antes que a insensibilização ocorra (Erikson et al. 1997; Ottera et al. 2001).

### **3.1.2. Avaliação da resposta fisiológica ao stress**

Tal como acontece com outros vertebrados, os peixes respondem aos desafios ambientais com uma série de ajustes neuroendócrinos adaptativos, a qual se denomina de "resposta ao stress" (Braithwaite and Ebbesson 2014). Para avaliar o nível de stress inerente a cada método de abate, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de cortisol, glucose, lactato e proteínas totais, a partir das amostras de sangue colhidas imediatamente após a morte. Estes constituintes plasmáticos são comumente utilizados como indicadores de stress, em especial o cortisol e a glucose (Woodward and Strange 1987). As concentrações plasmáticas destes indicadores de stress foram analisadas nos diferentes grupos e comparadas com os valores da corvina em repouso (anestesiada com fenoxietanol). Certos anestésicos reduzem ou bloqueiam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) (Iwama et al. 1997), o que resulta na supressão do eixo HPI e libertação de cortisol, a principal hormona para a superação de stress em peixes (Tort et al. 1998).



**Tabela 13 - Concentração plasmática dos indicadores de stress (cortisol, glucose, lactato e proteínas totais) de amostras de sangue colhidas em corvinas (*Argyrosomus regius*) imediatamente após o abate por diferentes métodos: termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ), asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Um grupo adicional, colocado numa tina de 300L com 22,5mL com fenoxietanol, é dado como grupo controlo. Os resultados são expressos em ng/mL e mg/mL, como média e desvio padrão (n = 6 em cada grupo).**

	Cortisol (ng/ml)	Glucose (mg/ml)	Lactato (mg/ml)	Proteínas totais mg/ml
<b>Controlo</b>	111,23 ± 29,042	61,345 ± 9,548	12,207 ± 1,533	28,057 ± 3,620
<b>TN</b>	297,058 ± 51,176	139,326 ± 13,683	54,64 ± 2,569	33,823 ± 3,057
<b>SM</b>	190,415 ± 19,934	70,642 ± 7,446	17,082 ± 2,275	33,218 ± 3,339
<b>IJ</b>	129 ± 32,556	68,034 ± 6,568	14,218 ± 2,365	31,768 ± 4,138
<b>AF</b>	487,995 ± 82,777	312,444 ± 36,63	64,147 ± 4,721	33,992 ± 3,479

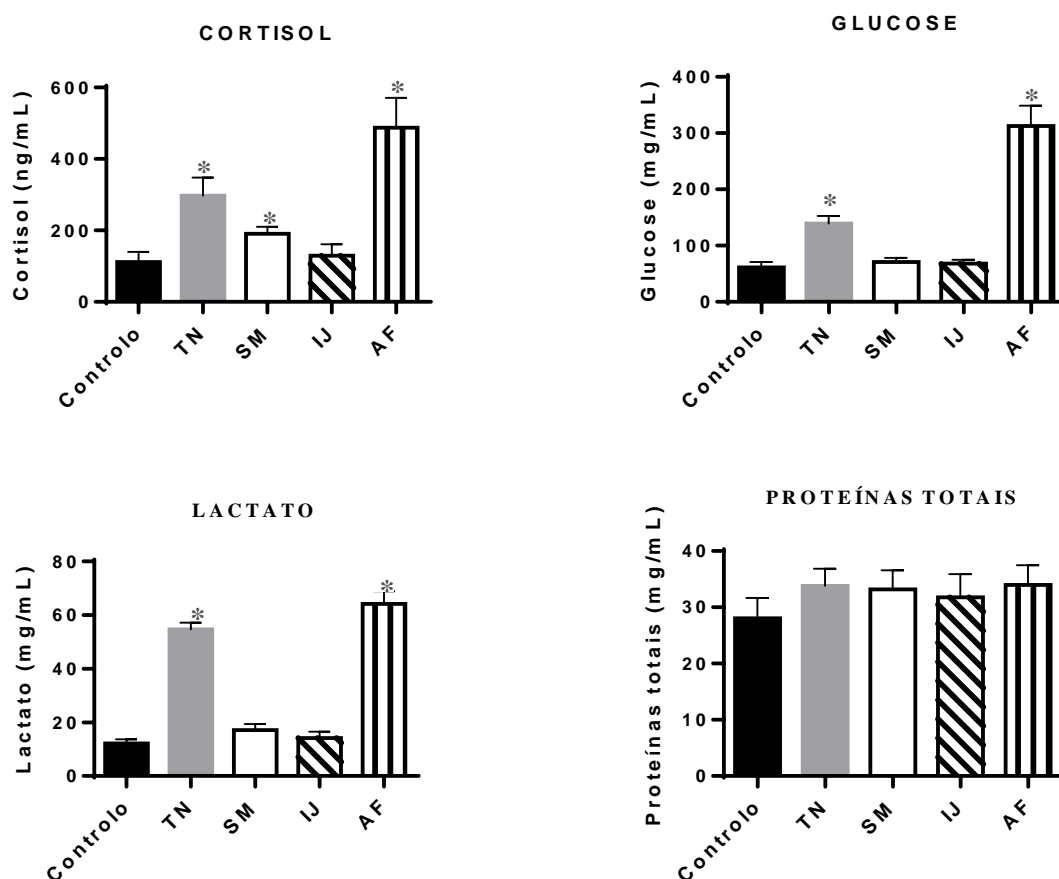
Ao comparar a concentração de cortisol plasmático do grupo controlo com os diferentes grupos, é possível observar um aumento de 3,4 vezes no grupo AF, enquanto que no grupo TN e SM observa-se um aumento de 1,7 e 0,7 vezes, respetivamente (tabela 13). O grupo IJ é o único que não demonstra diferença significativa ( $P > 0,05$ ) relativamente ao grupo controlo na concentração de cortisol plasmático (tabela 13). Os valores de cortisol são muito utilizados para a avaliação do stress em peixes (Bonga 1997; Lima et al. 2006), no entanto, a resposta do cortisol varia muito, até na mesma espécie (Fagundes and Urbinati 2008). Assim, num dado grupo de peixes, tanto podem existir peixes que respondem com um nível consideravelmente alto de cortisol, como peixes que apresentem uma resposta mais discreta, o que pode explicar os valores do desvio padrão. O aumento dos níveis de cortisol, pode ter como consequências um aumento do batimento cardíaco, maior consumo de oxigénio, mobilização da fonte de energia e aumento da glucose plasmática (Barry et al. 1993).

Ao analisar as concentrações de glucose plasmática relativamente ao grupo controlo, no grupo AF observa-se um aumento de 4,1 vezes, enquanto que no grupo TN observa-se um aumento de 1,3 vezes (tabela 13). SM e IJ não apresentam diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), relativamente ao grupo controlo (tabela 13). As concentrações plasmáticas de glucose no grupo AF e TN, demonstram uma resposta catabólica típica após o stress (Rotllant et al. 2001), de forma a fornecer recursos extras de energia para que o animal supere a perturbação.

Quando comparadas ao grupo controlo, as concentrações plasmáticas de lactato demonstram um aumento de 4,3 e de 3,5 vezes no grupo AF e TN, respetivamente (tabela 13). A maior mobilização e utilização de energia aquando do aumento da atividade muscular pode ter conduzido ao aumento de lactato plasmático. Os peixes do grupo AF e TN

demonstraram movimentos de luta, o que pode indicar um impacto maior e grande atividade metabólica nos músculos e portanto do acúmulo de metabolitos como o lactato plasmático (Roth et al. 2002; Iwama et al. 2004). Já o grupo SM e IJ, não apresentaram diferenças significativas ( $P>0.05$ ), relativamente ao grupo controlo (gráfico 2), o que pode ser justificado pela atividade muscular destes peixes ter cessado quase imediatamente após o método de abate ter sido aplicado.

Através dos resultados observa-se que as concentrações plasmáticas das proteínas totais apresentam valores muito aproximados nos diferentes grupos, sem qualquer diferença significativa ( $P>0,05$ ) (gráfico 2). Por este motivo, a concentração plasmática de proteínas totais, não é o melhor indicador de stress, neste estudo.



**Gráfico 2 – Concentração plasmática de cortisol, glucose, lactato e proteínas totais, das amostras de sangue colhidas em corvinas (*Argyrosomus regius*), após o abate com a aplicação dos métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ), e asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Um grupo adicional, que foi colocado numa tina de 300L com 22,5mL com fenoxietanol (anestesiado), é dado como grupo controlo. Colunas com asteriscos apresentam diferenças significativas em relação ao grupo controlo ( $P<0,05$ , pelo teste de Tukey). Os resultados são expressos, em ng/mL e mg/mL, como média e desvio padrão ( $n = 6$  em cada grupo).**

Todos os grupos, em especial o AF apresentam concentrações superiores dos indicadores de stress em relação ao grupo controlo (anestesiado). SM e IJ apresentam os valores mais próximos do grupo controlo, sobretudo IJ, que não apresenta diferença significativa em nenhum indicador (gráfico 2). Assim, o método de abate que provocou uma resposta fisiológica ao stress mais discreta foi o *iki jime* (grupo IJ) e de acordo com vários autores, este método aplicado com precisão resulta no mais ético (Boyd et al. 1984; Poli et al. 2005; Davie and Kopf 2006). Os resultados revelam também que a termonarcose e a asfixia por exposição ao ar foram os métodos de atordoamento e abate que provocaram uma resposta fisiológica ao stress mais grave. O abate por termonarcose é considerado uma prática stressante para várias espécies (Bagni et al. 2002; EFSA 2004; Conte 2004). De todos os grupos, a asfixia por exposição ao ar apresentou a resposta fisiológica ao stress mais grave, o que pode estar relacionado com o maior período de tempo necessário para alcançar a insensibilização (1160s). Quando se usa este método o animal permanece consciente por longos períodos de tempo antes que a insensibilização ocorra, por consequência, várias autoridades consideram a asfixia por exposição ao ar como uma prática não ética (FAWC 1996). Os efeitos da exposição ao ar nos peixes variam com fatores como a temperatura do ar e a espécie de peixe, contudo, a asfixia sob qualquer forma parece ser uma prática prejudicial para o bem-estar dos peixes

## **3.2. Qualidade do peixe**

### **3.2.1. Avaliação da evolução do músculo *post mortem***

*Rigor mortis* é o primeiro processo físico *post mortem* que afeta diretamente a qualidade do músculo (Nakayama et al. 1994), ao pré-determinar o prazo de validade do peixe fresco (Amlacher, 1961). O *rigor mortis* no peixe tem uma duração média de um dia ou mais, e o momento em que este se instala e desaparece está intimamente relacionado com o declínio do ATP (Iwamoto et al. 1987). É estabelecido quando a concentração de ATP no músculo se reduz para valores  $< 1.0$  mol (Hamada-Sato et al. 2005). Abaixo deste nível a actina e a miosina associam-se e formam o complexo acto-miosina (Cappeln and Jessen 2002), que permanece ligado irreversivelmente e à medida que o *rigor mortis* se estabelece os filamentos não conseguem deslizar entre si (Pate and Brokaw 1980).

O desenvolvimento do *rigor mortis* em relação a vários agentes stressantes, como a densidade animal, captura ou colheita, foi estudado por vários autores, no entanto, no que se refere ao efeito do abate em si menos estudos foram realizados (Morzel et al. 2002). De acordo com Erikson et al. (1997), os peixes que lutam durante o abate entram em *rigor mortis* muito rapidamente.

O conteúdo muscular de ATP no momento da morte é afetado pelo stress (Berg et al. 1997; Lowe et al. 1993; Sigholt et al. 1997), desta forma, o desenvolvimento do *rigor mortis* também é um indicador de stress. Para o estudo da evolução do músculo *post mortem* recorreu-se à avaliação do Estado de rigor (tabela 14) e determinação do índice de rigor (IR) (tabela 15).

### 3.2.1. Estado de rigor

Através da avaliação do estado de rigor, com atribuição de valores de 0 a 5, o grupo AF demonstrou apresentar o estabelecimento de *rigor mortis* mais precoce. No tempo amostragem 5h *post mortem*, o grupo AF já apresentava um estado de rigor muito forte (5), com o corpo extremamente rígido em forma de bastão, enquanto que o grupo TN se encontrava no início do rigor, apenas com um primeiro sinal de rigidez na zona da cauda (figura 17A). Já o grupo SM e IJ não apresentaram nenhum sinal de rigidez, num estado de pré-rigor (0). Nestes dois últimos grupos, apenas a partir das 22h foram registados sinais de estabelecimento de *rigor mortis*.

**Tabela 14 - Avaliação do estado de *rigor mortis* de corvinas (*Argyrosomus regius*), após o abate pelos métodos: termonarcose (TN), secção medular (SM), *iki jime* (IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Avaliações registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h). Aos peixes é atribuído um valor de 0 a 5, onde o limite mínimo corresponde à ausência de rigor, e o limite máximo corresponde a um estado de rigor muito forte (Curran et al. 1986).**

	TN	SM	IJ	AF
<b>5h</b>	(1) Sinal de rigidez	(0) Ausência de rigor	(0) Ausência de rigor	(5) Rigor muito forte
<b>22h</b>	(5) Rigor muito forte	(3) área total em rigor	(2) área maior em rigor	(2) área > em rigor
<b>29h</b>	(5) Rigor muito forte	(4) Rigor mais forte	(3) área total em rigor	(1) Sinal de rigidez
<b>46h</b>	(2) área > em rigor	(1) Sinal de rigidez	(2) área maior em rigor	(0) Ausência de rigor
<b>52h</b>	(2) área > em rigor	(1) Sinal de rigidez	(2) área maior em rigor	(0) Ausência de rigor

Tal como o estabelecimento, a resolução do *rigor mortis* em AF também demonstrou ser precoce, em relação aos restantes grupos, uma vez que a partir do tempo amostragem 22h se registou uma tendência decrescente do estado de rigor, enquanto que nos restantes grupos esta tendência foi registada a partir do tempo amostragem 46h *post mortem*.



**Figura 17 - Peixe em estado pré-rigor (A); Peixe em pleno estado de *rigor mortis* (B) (fotos originais).**

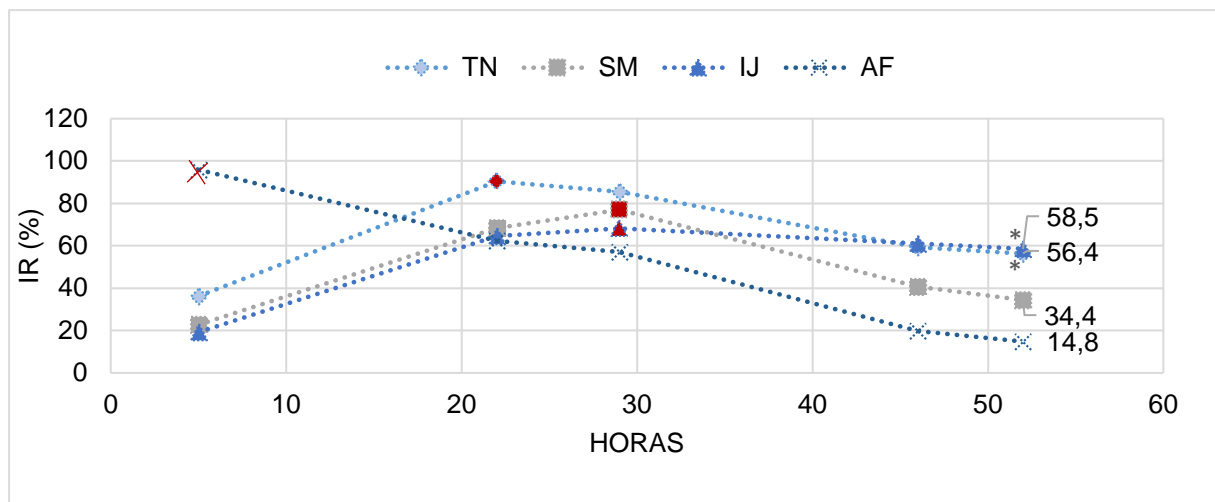
### 3.2.2. Índice de rigor

Para avaliar a evolução do músculo *post mortem*, para além da avaliação do estado de rigor também foram registadas medidas baseadas na curvatura da cauda, para o cálculo do índice de *rigor mortis* (tabela 15). Foi necessário registar os valores de L0, medição do comprimento da inclinação da cauda imediatamente após a insensibilização, para o cálculo do IR no decorrer de 52h *post mortem*. A média e o respetivo desvio padrão de L0 em TN foi de  $12,8 \pm 0,9$  cm, em SM foi de  $14,3 \pm 2,3$  cm, em IJ foi  $13,9 \pm 1,7$  cm e em AF foi de  $13,1 \pm 1,4$ .

**Tabela 15 - Comprimento da inclinação da cauda e índice de rigor (calculado de acordo com Bito et al. 1983), de corvinas (*Argyrosomus regius*) registado após o abate por: termonarcose (TN), secção medular (SM), *iki jime* (IJ) e asfixia por exposição ao ar (AF). Medições registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h). Os resultados do comprimento da inclinação da cauda são expressos em cm, com calibração de a aproximação de 0,1 mm, como média e respetivo desvio padrão; e os do índice de rigor são expressos em percentagem como média e respetivo desvio padrão (n=6 em cada grupo). Os resultados, seguidos de letras minúsculas, nas linhas, não apresentam diferenças significativas ( $P>0,05$ , teste de Tukey) entre os diferentes grupos, no mesmo tempo amostragem, no decorrer de 52h *post mortem*.**

	TN		SM		IJ		AF	
	Comp.(cm)	IR (%)	Comp.(cm)	IR (%)	Comp.(%)	IR (%)	Comp.(cm)	IR (%)
<b>5h</b>	8,2±0,6	36,2	11,1±1,3	22,7a	11,2±1,4	19,2a	0,5±0,1	95,9
<b>22h</b>	1,2±0,1	90,4	4,5±0,2	68,4a	4,9±1,2	64,5ab	4,9±0,2	62,3b
<b>29h</b>	1,9±0,1	85,5	3,3±0,2	77a	4,4±0,1	68,2a	5,6±0,5	57,1
<b>46h</b>	5,2±0,2	59,4a	8,5±1,6	40,8	5,4±0,3	61,2a	10,5±2,2	19,9
<b>52h</b>	5,5±1	56,4a	9,4±1	34,3	5,8±0,5	58,5a	11,2±3,1	14,8

O grupo AF apresentou diferenças significativas de IR, em relação aos restantes grupos em todos os tempos amostragem, exceto às 22h (62,3%), sem diferença significativa com IJ (64,5%), contudo este grupo estava na fase de estabelecimento do *rigor mortis*, enquanto AF já tinha atingido o rigor pleno e estava na fase de resolução. Nos últimos tempos de amostragem, 46h e 52h *post mortem*, TN e IJ começaram a apresentar valores aproximados, sem diferença significativa entre si. O IR máximo registado no grupo AF foi às 5h *post mortem* (95,9%) e no grupo TN foi às 22h *post mortem* (IR = 90,4 %), enquanto que os valores mais altos de IR registados no grupo SM e IJ foram no tempo de amostragem 29h (77% e 68,2%, respetivamente) (tabela 15). Sabe-se que o rigor pleno é atingido aos 100%, pelo que o rigor pleno dos diferentes grupos terá sido atingido um pouco antes ou depois dos respetivos tempos de amostragem com IR máximo registado. Em concordância com a avaliação do estado de rigor, através do índice de *rigor mortis*, é possível observar que o grupo AF e TN apresentaram um estabelecimento de *rigor mortis* mais precoce, sobretudo AF. Estes dois grupos manifestaram uma maior atividade muscular, o que pode ter conduzido a uma diminuição rápida das reservas de energia, isto é, de adenosina trifosfato (ATP) e, por sua vez, ter acelerado o estabelecimento do *rigor mortis*, com diminuição do período pré-rigor. O mesmo aconteceu em estudos com robalo (*Dicentrarchus labrax*), dourada (*Sparus aurata*) (Bagni et al. 2007), e com o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Erickson et al. 2008), em que a asfixia por exposição ao ar e a termonarcose foram altamente stressantes, o que acelerou o estabelecimento do *rigor mortis*. Já no grupo IJ, em que ocorreu a destruição completa do cérebro e, por sua vez, insensibilização imediata, a energia remanescente no tecido muscular pode ter sido usada para manter o metabolismo celular *post mortem*, e assim atrasar o estabelecimento do *rigor mortis*. Da mesma forma, Morzel et al. (2002) observaram que o método de abate com maior ou menor stress também alterou o estabelecimento do *rigor mortis* no pregado (*Psetta maxima*), em que os peixes abatidos de forma mais rápida (menos stressante) atingiram o *rigor mortis* pleno após 4 dias de armazenamento em gelo. Ao correlacionar os dados da avaliação do estado do rigor (tabela 14) com o índice de *rigor mortis* (tabela 15), observa-se que a partir de IR  $\pm$  30%, os peixes encontravam-se num estado inicial de *rigor mortis* e o rigor pleno foi atingido a partir de IR  $\pm$  85%.



**Gráfico 3 – Curva de desenvolvimento do IR (índice de rigor) em corvinas (*Argyrosomus regius*) avaliada nos métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF). Medições registadas no decorrer de 52 horas *post mortem* (5, 22, 29, 46 e 52h). Os resultados são expressos em percentagem como média (n=6 em cada grupo). Resultados com “\*”, não apresentam diferença significativa entre si ( $P>0,05$ , pelo teste de Tukey) no último tempo amostragem.**

A resolução do *rigor mortis* também deve ser acompanhada, uma vez que coincide com a autólise, que contribui para a perda geral da qualidade do peixe (FAO 1995). A resolução do *rigor mortis* deve-se principalmente à ação de enzimas proteolíticas endógenas (catepsinas), bem como enzimas microbianas, que resultam na digestão das proteínas miofibrilares (Sebastio et al. 1996). O grupo AF às 22h apresentou uma média de IR de 62,3%, com diferença significativa relativamente ao tempo de amostragem anterior (95,9%), o que demonstra uma tendência decrescente (tabela 15). O grupo TN demonstrou ter uma ligeira tendência decrescente às 29h, e os grupos SM e IJ às 46h *post mortem*. No último tempo de amostragem, 52h *post mortem*, o grupo AF apresentou 14,8% de IR, enquanto os grupos SM, TN e IJ apresentaram 34,3%, 56,4 % e 58,5%, respetivamente (gráfico 3). A resolução do rigor demonstrou ser mais lenta em IJ e TN, sem diferença entre si no último tempo de amostragem, e significativamente mais rápida em AF. O método termonarcose apesar de ter provocado uma resposta ao stress grave, não acelerou o processo de *rigor mortis*, ao contrário do que aconteceu com AF. No presente estudo, o método asfixia por exposição ao ar (grupo AF) resultou numa aceleração significativa no início e resolução do *rigor mortis* em comparação com os restantes grupos. De acordo com Bagni et al. (2007), quando as reservas de energia muscular se esgotam devido ao exercício *ante mortem*, o início do *rigor mortis* não só começa mais cedo, como também é mais forte. Os resultados estão relacionados com o comportamento da corvina no período *ante mortem*, que demonstrou luta e agitação na asfixia

por exposição ao ar, ao invés da insensibilização imediata conseguida pelo método *iki jime*. Assim, os métodos de atordoamento e abate têm um efeito significativo no desenvolvimento do *rigor mortis*, daí ser amplamente utilizado como um indicador de stress (Ribas et al. 2007; Lowe et al. 1993).

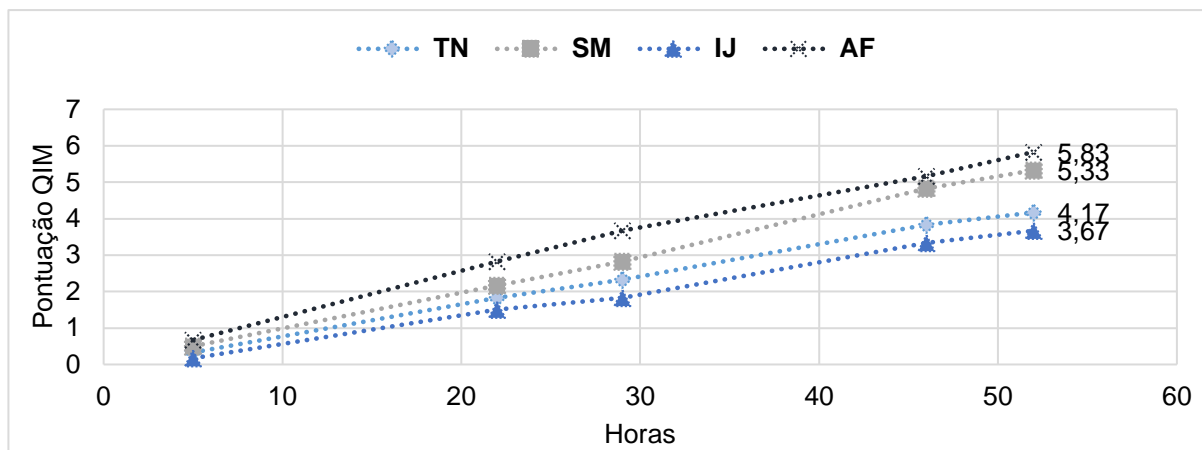
A avaliação do *rigor mortis* tem importância tecnológica e económica. É útil para o controlo de qualidade, porque o manuseamento, embalagem, processamento ou congelamento devem ser evitados quando os peixes estiverem no estado de rigor (Berg et al. 1997). Do ponto de vista de frescura, estes processos devem ser executados enquanto os peixes estão num estado de pré-rigor (Berg et al. 1997). Em alternativa, o peixe deve passar por todo o processo de *rigor mortis* antes de se iniciar o processamento (Berg et al. 1997). Em termos tecnológicos, também é importante atrasar o *rigor mortis*, uma vez que a deterioração se acentua após a resolução do *rigor mortis*. Uma das principais vantagens do peixe de produção em relação ao peixe selvagem é o grande nível de controlo, que permite que o abate ocorra em tempo e local pré-determinados, o que torna possível processar o peixe antes da instalação do *rigor mortis* (Stien et al. 2005).

### **3.2.2. Avaliação sensorial do grau de frescura**

A avaliação sensorial demonstrou uma diminuição progressiva da frescura em todos os grupos no decorrer de 52h *post mortem* (gráfico 4). De forma geral, foram anotadas alterações como alteração da cor da cavidade bucal (de alaranjada passou para acastanhada), perda gradual de brilho superficial, globo ocular ligeiramente menos límpido, empaldecimento da cor das brânquias, ligeiro aumento do odor das brânquias e variação da firmeza do músculo do peixe consoante o estado de rigor.

De acordo com o esquema QIM utilizado no estudo, o grupo TN e o grupo IJ apresentaram as menores pontuações médias no último tempo de amostragem, ao fim de 52h *post mortem*, com 4,17 e 3,67 respetivamente. Enquanto no grupo SM e AF as pontuações médias foram 5,33 e 5,83, respetivamente. A avaliação sensorial revelou que a frescura dos peixes foi perdida de forma gradual em todos os grupos, contudo demonstrou ser mais rápida no grupo do abate por asfixia por exposição ao ar e mais lenta no grupo do abate por *iki jime*. O método *iki jime*, de origem japonesa, para além de ser considerado uma prática ética, é conhecido por ser um método que promove a qualidade do peixe.





**Gráfico 4 – Dinâmica da média das pontuações do Índice de Qualidade (IQ), em escala de 0 a 17 de corvinas (*Argyrosomus regius*), após os métodos de atordoamento e abate termonarcose (grupo TN), secção medular (grupo SM), *iki jime* (grupo IJ) e asfixia por exposição ao ar (grupo AF), armazenadas numa camara frigorífica (2-4º). Medições registadas no decorrer de 52 horas post mortem (5, 22, 29, 46 e 52h).**

Neste estudo foi utilizado um esquema QIM adaptado para a avaliação sensorial do grau de frescura da corvina. O painel de avaliadores não era um painel treinado, pelo que estas condições podem ter influenciado os resultados. Contudo, é possível observar que o desenvolvimento do *rigor mortis* pode influenciar a qualidade sensorial do peixe, uma vez que o estabelecimento precoce e a rápida resolução do *rigor mortis* no grupo AF, coincidiu com a rápida involução da frescura, comparativamente aos restantes grupos.

#### 4. Conclusão

Através do estudo é possível apoiar a tese de que os peixes são seres dotados de sensibilidade, visto que responderam ao desafio ambiental inerente ao abate, ao evocarem uma resposta com alterações comportamentais e alterações nas concentrações plasmáticas dos indicadores de stress. O período de tempo necessário para induzir a insensibilização demonstrou ser importante, uma vez que quanto mais rapidamente se alcançar a insensibilização, mais discreta foi a resposta ao stress. A asfixia por exposição ao ar foi o método que demorou mais tempo a induzir a insensibilização, com reações comportamentais violentas e agressivas, assim como favorece a mais elevada concentração plasmática dos indicadores de stress. Pelo contrário, o *iki jime* foi o método mais rápido, em que se verificou ausência imediata de todos os parâmetros comportamentais e a mais reduzida concentração dos indicadores de stress.

O equipamento de eletronarcose utilizado no estudo não demonstrou induzir insensibilização. Talvez uma gestão diferente dos parâmetros elétricos e a sua aplicação a peixes de dimensões inferiores resultem numa combinação mais eficaz. Exceto a eletronarcose, é possível classificar os métodos estudados como irreversíveis, uma vez que

não ocorreu a recuperação de nenhum parâmetro comportamental, ou seja, a consciência não foi recuperada e, por isso, não foi necessário nenhum método complementar.

Também é possível concluir que, a resposta ao stress inerente a cada método de abate pode influenciar a qualidade do peixe, ao interferir no desenvolvimento do *rigor mortis* e, desta forma, na taxa de involução da frescura. O método *iki jime*, com a resposta ao stress mais discreta, demonstrou ter o desenvolvimento de *rigor mortis* mais lento. Pelo contrário, a asfixia por exposição ao ar, com a resposta ao stress mais evidente, demonstrou ter um desenvolvimento de *rigor mortis* mais acelerado, assim como a deterioração de qualidade sensorial mais rápida.

A resposta da corvina variou em função dos diferentes métodos de atordoamento e abate, quer na componente bem-estar animal, quer na qualidade. Posto isto, cada método estudado demonstrou ter vantagens e desvantagens:

- termonarcorese foi um método de fácil execução, onde não foi necessário remover os peixes da água, no entanto, provocou uma resposta ao stress grave. Já em termos de qualidade, demonstrou ser benéfico ao atrasar o desenvolvimento do *rigor mortis* e, por sua vez, a taxa de involução da frescura;

- a asfixia por exposição ao ar também foi uma prática de fácil execução, que requer pouca mão de obra, contudo, demonstrou ser uma prática muito stressante. O longo período de tempo antes que a morte ocorra, acompanhado de comportamentos de fuga violentos, aumenta o risco de hemorragias e hematomas, o que compromete a qualidade do produto;

- a secção medular provocou uma rápida insensibilização, no entanto, foi necessária uma contenção efetiva para assegurar a proteção do animal e do operador, já que foi utilizado um instrumento afiado. Não demonstrou ser o método com os melhores resultados em termos de qualidade;

- o método *iki jime* demonstrou ser a prática de abate mais ética, contudo, requer grande destreza e conhecimento anatómico. Originou a resposta ao stress mais discreta e bons resultados em termos de qualidade;

Por último, não foi possível avaliar o método eletronarcorese, uma vez que não foram obtidos resultados, contudo é possível reter que é um método difícil de padronizar para todas as espécies, no entanto, parece ser uma prática com uma reduzida resposta ao stress, uma vez que os peixes não precisam de ser removidos da água. Também apresenta a vantagem de ser possível o abate coletivo de peixes.

Após a visão integrada dos efeitos dos diferentes métodos de atordoamento e abate aplicados à corvina (*Argyrosomus regius*), é possível concluir que o método que minimizou o stress *ante mortem* e que maximizou a qualidade do peixe foi o *iki jime*. Os abates éticos, para além de terem em consideração o bem-estar animal, também dão origem a produtos de melhor qualidade.

### **III – PERCEÇÃO DO CONSUMIDOR SOBRE O ABATE DE PEIXES**

#### **1. Introdução**

Quando comparado aos mamíferos, o conceito de bem-estar animal em peixes é um conceito relativamente novo. No entanto, mesmo com um amplo consenso científico de que os peixes são sencientes, as práticas de abate são essencialmente desenvolvidas para otimizar o custo e a qualidade do produto, com pouca ou nenhuma consideração pelo bem-estar animal (Lines and Spence 2014). Muitas práticas de abate de peixes foram reconhecidas como problemáticas, no que se refere ao bem-estar animal (FAWC, 1996), o que confirma a necessidade de alterações legislativas relativas à proteção de peixes no abate. No entanto, são necessários mais pareceres científicos e socioeconómicos.

É de ter em consideração que, apesar deste setor ser relativamente novo e muito diversificado, quando comparado aos outros setores de produção animal, as tecnologias para melhoria do bem-estar dos peixes na etapa do abate estão a progredir. Torna-se importante conhecer se os cidadãos acompanham o crescimento do setor, e sobretudo qual a percepção da sociedade relativamente ao abate de peixes, de forma a conhecer qual o impacto que estas práticas podem ter no cidadão enquanto consumidor de peixe, e qual a necessidade de proteção dos peixes no momento do abate.

#### **2. Material e métodos**

##### **2.1. Inquérito por questionário**

O estudo que suportou a elaboração de um inquérito por questionário, tem como principal objetivo conhecer qual a percepção do consumidor sobre o abate de peixes. A aplicação do questionário teve início a 6 de Agosto e terminou a 25 de Novembro (2018), com deslocações ao Mercado Municipal de Coimbra e Mercado abastecedor da Região de Lisboa (MARL) e, sobretudo, com divulgação “online” pelo programa *Surveyhero*. Os inquiridos residem em Portugal, são consumidores de pescado e têm idade igual ou superior a 18 anos. O questionário foi subdividido em três grupos de questões: o primeiro grupo destina-se à caracterização sociodemográfica; o segundo grupo traça o perfil do consumidor quanto aos hábitos de consumo; e o terceiro grupo é direcionado para a percepção do consumidor sobre o abate de peixes.

Grupo 1 – Caracterização sociodemográfica:

- 1.Género;
- 2.Idade;
- 3.Local de residência;
- 4.Habilitações literárias;
- 5.Área profissional.

Grupo 2 - Perfil do consumidor face aos hábitos de consumo de pescado:

- 1.Frequência de consumo de pescado;
- 2.Origem do pescado que costuma consumir;
- 3.Fator mais influente na compra de pescado selvagem/aquacultura.

Grupo 3 – Perceção do consumidor face ao abate de peixes:

- 1.Consciência do consumidor face à presença de sensibilidade em peixes;
- 2.Fator a ter em consideração no abate de peixes;
- 3.Popularidade dos métodos de atordoamento e abate de peixes;
- 4.Métodos de atordoamento e abate que induzem mais/menos stress;
- 5.Influência do abate na qualidade do peixe;
- 6.Influência do abate na decisão de compra do peixe;
- 7.Consciência face ao abate humanitário.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Caracterização sociodemográfica**

A amostra foi constituída por 247 indivíduos, 73% são do sexo feminino (181 indivíduos) e apenas 27% são do sexo masculino (66 indivíduos). No que diz respeito à idade, grande parte dos inquiridos (48,2%, 119 indivíduos) encontra-se no grupo etário entre os 25 e os 45 anos e, de seguida, no grupo etário entre os 18 e os 24 anos (37,7%, 93 indivíduos). Enquanto que, 11,3% (28 indivíduos) encontram-se no grupo etário entre os 46 e os 65, e 2,8% (7 indivíduos) apresentam idade superior a 65 anos.

A maioria dos inquiridos (58,3%, 144 indivíduos) reside na região de Lisboa, a que se segue o Centro (24,7%, 61 indivíduos), Norte (11,8%, 29 indivíduos), Alentejo (3,2%, 8 indivíduos), Algarve (0,8%, 2 indivíduos) e outras regiões (1,2%, 3 indivíduos).

Quanto às habilitações literárias, verifica-se que 48,2% dos inquiridos (119 indivíduos) possuem licenciatura, 23,1% (57 indivíduos) mestrado, 17,4% (43 indivíduos) frequentaram apenas o ensino secundário, 8,5% (21 indivíduos) o ensino básico e 2,8% (7 indivíduos) possuem doutoramento.

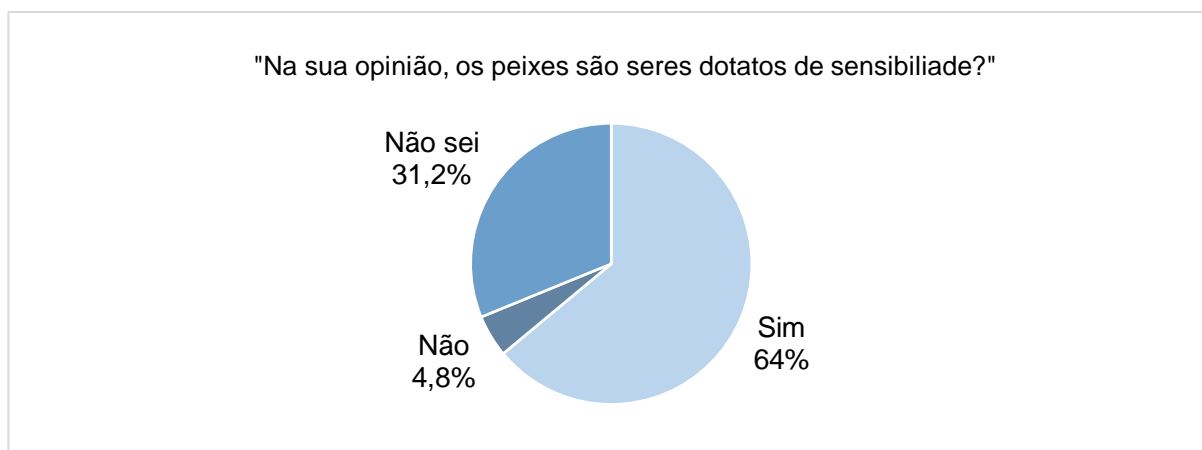
Relativamente à área profissional, 32% dos inquiridos (79 indivíduos) são da área de saúde e ciências e tecnologias, 23,5% (58 indivíduos) são de gestão e negócios, 15% (37 indivíduos) são de ciências humanas e sociais. O restante distribui-se pelas áreas profissionais comunicação e criatividade (13,4%, 33 indivíduos), engenharia e ciências exatas (6,9%, 17 indivíduos), agricultura/pescas (3,6%, 9 indivíduos) e outras (5,7%, 14 indivíduos).

### **3.2. Caracterização dos hábitos de consumo**

Perante a avaliação da frequência de consumo de pescado, 57% dos inquiridos (141 indivíduos) consome pescado 1 a 3 vezes por semana, 33% (81 indivíduos) consome 1 a 3 vezes por mês, 6% (16 indivíduos) consome 3 a 5 vezes por semana, e apenas 4% (indivíduos) consome pescado mais de 5 vezes por semana. No que diz respeito à origem do pescado consumido pelos inquiridos, 45,3% (112 indivíduos) consome peixe de ambas as origens (pescado selvagem e de aquacultura) e 32% (79 indivíduos) desconhece a origem do pescado que consome. O restante dos inquiridos apenas consome pescado selvagem (17,4%, 43 indivíduos) ou apenas pescado de aquacultura (5,3%, 13 indivíduos). Quanto à decisão de compra de pescado selvagem/pescado de aquacultura, os inquiridos selecionaram o paladar (34%, 84 indivíduos) e o valor nutricional (32%, 79 indivíduos) como fatores mais influentes na decisão de compra de pescado selvagem, seguido de bem-estar animal (21,1%, 52 indivíduos), grau de controlo (6,9%, 17 indivíduos), preço (2,8%, 7 indivíduos) e 3,2% (8 indivíduos) não consome pescado selvagem. Enquanto que, na compra de pescado de aquacultura, a maioria dos inquiridos selecionou o fator preço (51,4%, 127 indivíduos) e o grau do controlo (30%, 74 indivíduos) como fatores mais influentes, de seguida o bem-estar animal (5,3%, 13 indivíduos), valor nutricional (2,8%, 7 indivíduos), paladar (2%, 5 indivíduos), e 8,5% (21 indivíduos) não consome pescado de aquacultura.

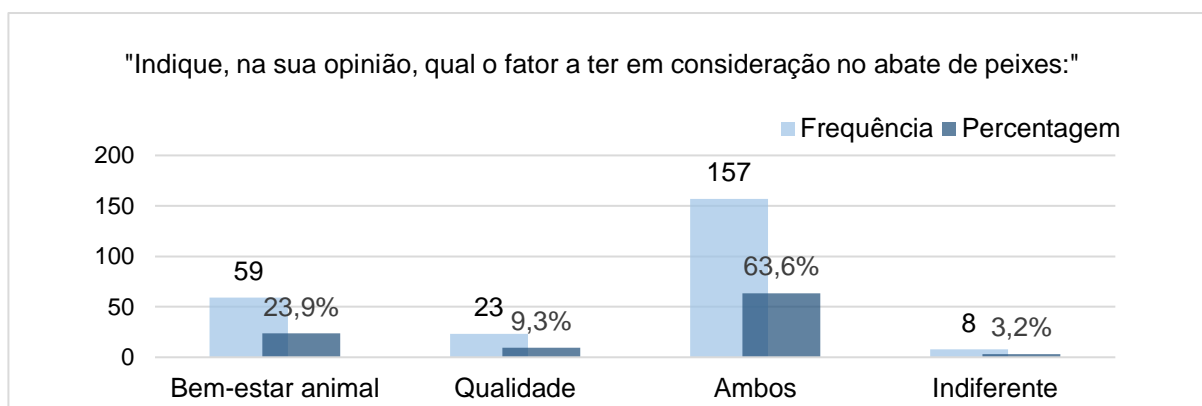
### **3.3. Avaliação da perceção do consumidor sobre o abate de peixes**

Através da questão “Na sua opinião, os peixes são seres dotados de sensibilidade?”, é possível observar que, a maioria dos inquiridos (64%, 158 indivíduos) é consciente da presença de sensibilidade nestes animais (gráfico 5). No entanto, 31,2% dos inquiridos (77 indivíduos) responderam “não sei”, e 4,8% (12 indivíduos) responderam “não”.



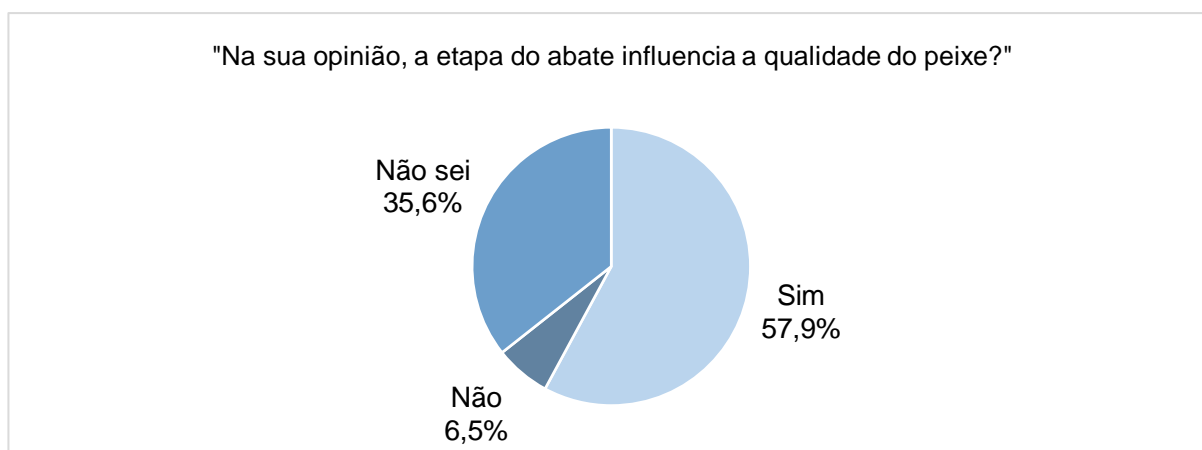
**Gráfico 7 – Distribuição da amostra para a questão “Na sua opinião, os peixes são seres dotados de sensibilidade?” de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem.**

Relativamente ao principal fator a ter em consideração no abate de peixes, a maioria (63,6%, 157 indivíduos) afirmou que, tanto o bem-estar animal como a qualidade, são fatores relevantes (gráfico 6). No entanto, 23,9 % dos inquiridos (59 indivíduos) selecionou apenas a opção “bem-estar animal”, e 9,3% (23 indivíduos) selecionou a “qualidade”, enquanto que o restante dos inquiridos (3,2%, 8 indivíduos) demonstrou indiferença.



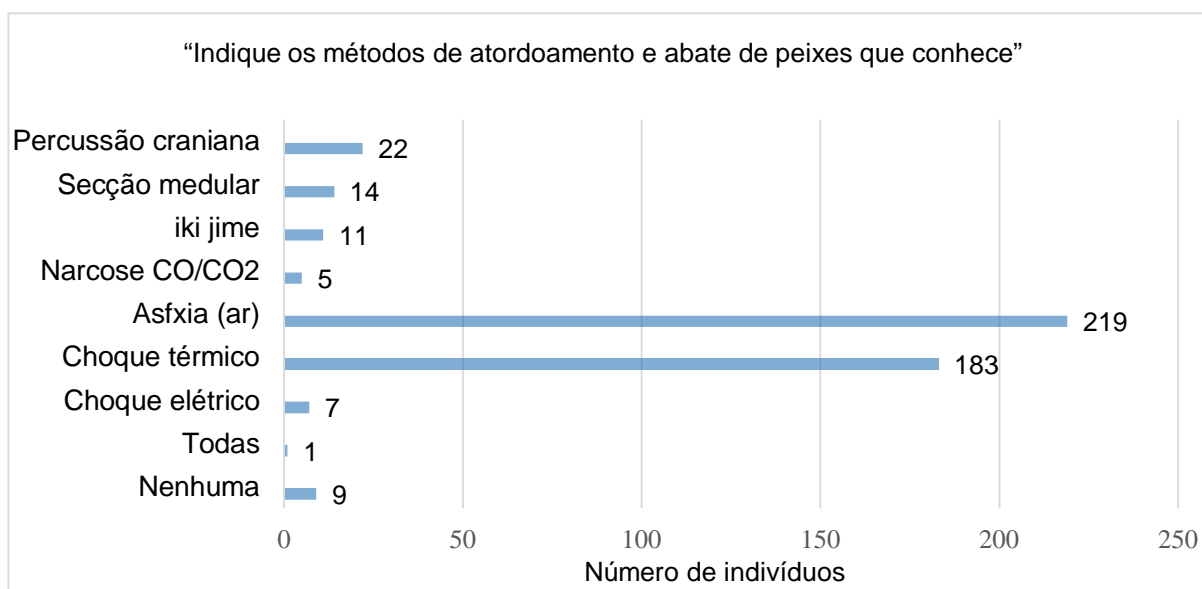
**Gráfico 6 – Distribuição da amostra para a questão: “Indique, o fator a ter em consideração no abate de peixes”, de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência e percentagem.**

Quando o inquirido foi abordado acerca da influência da etapa do abate na qualidade do peixe (gráfico 7), a maioria (57,9 %, 143 indivíduos) afirmou que esta existe, e apenas 6,5 % (16 indivíduos) negaram a sua influência. É de notar que 35,6 % (88 indivíduos) demonstrou não ter perceção acerca da influência do abate na qualidade do peixe.

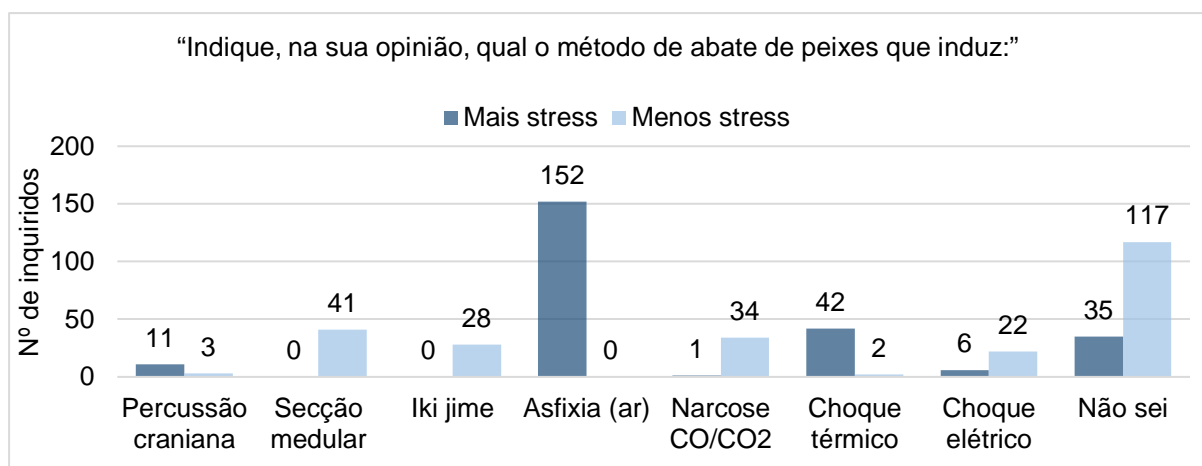


**Gráfico 7 - Distribuição da amostra para a questão: "Na sua opinião, a etapa do abate influencia a qualidade do pescado?" de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem.**

Relativamente ao conhecimento dos inquiridos face aos diferentes métodos de atordoamento e abate, é possível observar que a ordem decrescente de popularidade é: asfixia (ar) (219 indivíduos), choque térmico (termonarcose) (183 indivíduos), percussão craniana (22 indivíduos), secção medular (14 indivíduos), *iki jime* (11 indivíduos), abate elétrico (eletroanestesia/eletrocussão) (7 indivíduos) e narcose por CO/CO<sub>2</sub> (5 indivíduos) (gráfico 8). Apenas um inquirido respondeu "todos", enquanto 9 responderam "nenhum".

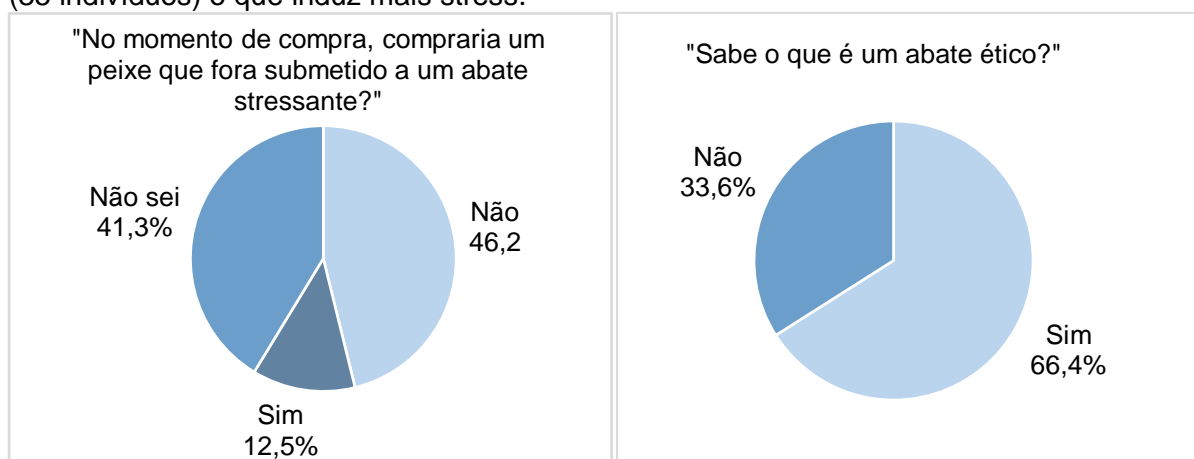


**Gráfico 8 - Distribuição da amostra para a questão "Indique os métodos de atordoamento e abate de peixes que conhece", de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência.**



**Gráfico 9 - Distribuição da amostra para a questão “Indique, na sua opinião, qual o método de abate de peixes que induz: mais/menos stress”, de um total de 247 indivíduos, expressa em frequência.**

Através do gráfico 9, é possível observar que, no que se refere aos diferentes métodos de atordoamento e atordoamento e atordoamento e atordoamento e atordoamento e abate de peixes, a asfixia por exposição ao ar (61,5%, 152 indivíduos) e o choque térmico (17%, 42 indivíduos) foram considerados os métodos que induzem mais stress, com grande diferença em relação às restantes. Enquanto que, os mais selecionados como métodos que induzem menos stress foram a secção medular (16,6%, 41 indivíduos), narcose com CO/CO<sub>2</sub> (13,8%, 34 indivíduos) e *iki jime* (11,3%, 28 indivíduos). Contudo, grande parte dos inquiridos demonstrou não saber qual o método que induz menos stress (47,4%, 117 indivíduos) e 14,2% (35 indivíduos) o que induz mais stress.



**Gráfico 10 - Distribuição da amostra para a questão “No momento de compra, compraria um peixe que fora submetido a um abate stressante?” e para a questão “Sabe o que é um abate ético?” de um total de 247 indivíduos, expressa em percentagem.**



Relativamente à influência que o método de abate pode ter na decisão de compra do consumidor, 46,2% dos inquiridos (114 indivíduos) respondeu que não comprariam peixe que fora sujeito a um método de abate considerado stressante, enquanto 41,3% (102 indivíduos) respondeu “não sei” e os restantes 12,5% (31 indivíduos) responderam “sim” (gráfico 10). Por último, perante a questão “Sabe o que é um abate ético?”, a maioria (66,4%, 164 indivíduos) respondeu “sim” e 33,6% (83 indivíduos) respondeu “não” (gráfico 11).

Posto isto, o perfil do inquirido é, na sua maioria, do sexo feminino, com idade compreendida entre os 25 e 45anos, residente na Grande Lisboa e com escolaridade igual ou superior ao 12º ano, e é formado sobretudo na área de ciências e tecnologias e de saúde. Relativamente aos hábitos de consumo pescado, a frequência média de consumo é de 1 a 3 vezes por semana, tanto de origem selvagem como de aquacultura. Os fatores mais influentes na decisão de compra de pescado selvagem são o paladar e o valor nutricional, enquanto que, na compra de pescado de aquacultura são o fator preço e o grau do controlo. Quanto ao abate de peixes, o consumidor demonstra já ter algum conhecimento, no entanto, ainda existe falta de informação neste domínio. Talvez por serem animais filogeneticamente mais afastados que os mamíferos, uma grande parte de inquiridos desconhece que os peixes são dotados de sensibilidade. Contudo, o consumidor começa a demonstrar preocupação com o bem-estar destes animais, ao nomear o bem-estar animal, para além da qualidade do peixe, como um fator a ter em consideração na etapa do abate. O método de abate mais conhecido por parte dos inquiridos é a asfixia por exposição ao ar e, de seguida, a termonarcose (choque térmico), com uma grande discrepância em relação aos outros métodos. Tal pode ser justificado pelo facto de a asfixia por exposição ao ar ser o método praticado na pesca tradicional, e o choque térmico ser um dos métodos mais comuns na aquacultura. Também selecionaram a asfixia por exposição ao ar como o método de abate que induz mais stress ao peixe, no entanto, demonstraram desconhecimento no que se refere aos métodos que podem induzir menos stress, ou seja, desconhecem alternativas éticas. O inquirido revela falta de informação no que se refere à existência de vários métodos de atordoamento e abate, assim como os seus efeitos no bem-estar destes animais. O método de abate utilizado pode ter impacto económico, ao influenciar a decisão de compra do consumidor, uma vez que a maioria dos inquiridos demonstrou que não comprariam peixe que tivesse sido sujeito a práticas de abate stressantes, o que se traduz num incentivo à prática de abates éticos.

#### **4. Conclusão**

Apesar de a maioria dos inquiridos apresentar escolaridade igual ou superior ao 12º ano, existe um grande desconhecimento acerca do abate de peixes, sobretudo no que se refere aos métodos de atordoamento e abate alternativos ao método praticado na pesca tradicional (asfixia por exposição ao ar). Contudo, o consumidor começa a demonstrar preocupação com o bem-estar dos peixes no momento do abate. Desta forma, é confirmada uma necessidade de melhorar a divulgação e consciencialização da população em relação ao abate de peixes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteção dos peixes na etapa do abate limita-se apenas ao princípio base “deve poupar-se aos animais qualquer dor, aflição ou sofrimento evitáveis durante a occisão e as operações complementares” (artigo 3.º, n.º 1 do Regulamento (CE) n.º 1099/2009 do Conselho relativo à proteção dos animais no momento da ocisão). Apesar de os peixes serem filogeneticamente mais distantes, existem evidências científicas que demonstram que, tal como os mamíferos, os peixes são dotados de sensibilidade, por conseguinte, também deveriam ser abrangidos pelo regulamento. Desta forma, deveriam ser propostas alterações legislativas relativas à proteção de peixes no abate, o que requer mais informações de carácter científico e socioeconómico.

Como a resposta aos métodos de atordoamento e abate varia consoante fatores como a espécie de peixe, há necessidade de mais pareceres científicos. É importante obter mais dados sobre os efeitos dos diferentes métodos, de forma a conhecer qual o método mais eficaz para determinada espécie de peixe. Também seria importante fazer mais estudos acerca da reversibilidade dos métodos, ou seja, ter conhecimento em que métodos pode ocorrer a recuperação da consciência, de forma a estabelecer a necessidade de um método complementar, e assim evitar a recuperação da mesma.

Os custos de adesão de melhores práticas de bem-estar no abate de peixes podem variar consoante os métodos de atordoamento e abate, assim como com a dimensão das empresas. Nas empresas de maior dimensão, melhorar as práticas de bem-estar provavelmente terá apenas um pequeno impacto no preço de custo, já nas pequenas empresas o impacto poderá ser maior. Nas grandes empresas, onde os custos de mão-de-obra são elevados, o investimento até poderia reduzir os custos. Assim, torna-se essencial a análise económica das práticas de abate, de forma a estudar o impacto do investimento da adesão de práticas mais éticas nos custos de produção.

Na pendência de alterações legislativas deveriam ser implementadas orientações nacionais de proteção dos peixes no momento do abate. Seria importante a elaboração de um guia de boas-práticas referente a esta etapa, visto que o pessoal responsável pelos procedimentos operacionais, como o maneo, desempenha um papel fulcral no bem-estar dos animais. É essencial que sejam desenvolvidas diretrizes específicas aos métodos de atordoamento e abate, com recomendações de parâmetros técnicos, a fim de assegurar a proteção dos peixes, tal como a dos operadores. Visto que os métodos de atordoamento e abate modernos exigem equipamentos mais complexos, é necessário um conhecimento mais profundo. Por conseguinte, deveriam existir cursos de formação, tal como a exigência de certificado de aptidão, ao pessoal responsável por determinadas operações de abate. Possuir conhecimentos básicos dos padrões comportamentais, da anatomia e fisiologia da espécie,

assim como conhecimentos técnicos especializados sobre o equipamento e o método de abate utilizado, permite melhorar as condições de bem-estar dos peixes.

A etapa do abate de peixes deveria passar a ser acompanhada por um médico veterinário. É importante a existência de monitorização do abate através de um responsável pelo bem-estar, com autoridade e competências técnicas, a fim de coordenar e acompanhar a implementação dos procedimentos nesta etapa. Deve ser realizada a monitorização da eficácia do abate, através da avaliação da insensibilização dos peixes, assim como o registo regular dos resultados, de forma a detetar a necessidade de eventuais alterações. Os equipamentos utilizados nas práticas de abate também deveriam ser sujeitos a um procedimento de aprovação prévia.

É de ter em consideração que, apesar deste setor ser relativamente novo e muito diversificado quando comparado com os outros setores de produção animal, as tecnologias para melhoria do bem-estar dos peixes estão a progredir. No entanto, seria interessante o desenvolvimento de novos métodos de atordoamento e abate específicos para as espécies de peixes.

Através do inquérito foi possível averiguar que, as condições de abate a que os peixes são sujeitos, pode influenciar a atitude do cidadão enquanto consumidor, o que pode representar um impacto no mercado. Assim, torna-se importante a partilha de informação, de forma a que os cidadãos acompanhem o crescimento do setor. A perceção dos consumidores face à necessidade da proteção dos peixes no abate, neste estudo, demonstrou variar consoante fatores como o local de residência, idade e formação, desta forma seria oportuno a realização de campanhas de sensibilização. O reforço desta preocupação com o bem-estar dos peixes no abate também contribui para melhorar a qualidade do peixe, e assim satisfazer as necessidades das características intrínsecas e extrínsecas do produto, requeridas pelo consumidor.

É importante prosseguir com um debate no futuro, respeitante às vantagens e desvantagens do abandono progressivo de certas práticas de abate de peixes, e adoção de práticas mais éticas.

## Bibliografia

- Acerete L, Balasch J, Espinosa E, Josa A, Tort L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*. 237(1-4):167-178.
- Acerete L, Reig L, Alvarez D, Flos R, Tort L. 2009. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 287(1-2):139-144.
- Aksnes A, Brekken B. 1988. Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *J Sci Food*. 45(1): 53-60.
- Alves F, Barbosa Júnior A, Hoffmann A. 2013. Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiol Behav*. 110-111:58-62.
- Amlacher E. 1961. Rigor-mortis in fish. In: Borgstrom, G, editor. *Fish as food*. New York: Academic Press; v.1, p. 385-409.
- Anil M. 1991. Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. *Meat Sci*. 30 (1):13-21.
- Aqui-S (2019). Aqui-s anaesthetic. New Zealand: Aqui-S New Zealand Ltd, AQNZ [Accessed 2019 Feb 17]. <https://www.aqui-s.co.nz/aqui-s-products/aqui-s>
- Ashley PJ. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl Anim Behav Sci*. 104(3-4):199-235.
- Ashley PJ, Sneddon LU, McCrohan CR. 2006. Properties of corneal receptors in a teleost fish. *Neurosci Lett*. 410(3):165-168.
- Bagni M, Civitareale C, Priori A, Ballerini A, Finoia M, Brambilla G, Marino G. 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 263(1-4):52-60.
- Bagni M, Priori A, Finoia MG, Bossu T, Marino G. 2002. Evaluation of preslaughter and killing procedures in sea bream (*Sparus aurata*). In: *Proceedings of the "Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow"*. European Aquaculture society Special Publication. 32:135–136.
- Barroso M, Careche M, Borderias AJ. 1997. Evaluation of fish freshness using mechanical methods. In: Olafsdóttir G Luten J, Dalgaard, P, Careche, M, Verres-Bagnis V, Martinsdóttir E, Heia K, editors. *Methods to Determine the Fish Freshness of Fish in Research and Industry*. Paris(FR): International Institute of Refrigeration. p. 355-362.
- Barry TP, Lapp AF, Kayes TB, Malison JA. 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*. 117(3-4):351-366.
- Barton, BA, Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann Rev Fish Dis*. 1:3-26.
- Barton BA, Peter RE. 1982. Plasma cortisol stress responses in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. *J Fish Biol*. 20(1):39-51.
- Barton BA. 1997. Stress in finfish: past, present and future - a historical perspective. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB, editors. *Fish stress and health in aquaculture*. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. New York: Cambridge University; p.1-33.
- Barton BA. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr Comp Biol*. 42(3):517-525.
- Barton J, Pretty JN, Bragg RE. 2009. The health benefits of walking in greenspaces of high natural and heritage value. *J Integr Environ Sci*. 6(4):261-278.
- Bateson P. (1991). Assessment of pain in animals. *Ani Behav*. 42(5):827-839.
- Batista J. 2012. Avaliação sensorial da frescura de produtos da pesca através do método QIM (Quality Index Method): revisão dos métodos desenvolvidos nos últimos 20 anos [Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos]. Algarve: Universidade do Algarve.
- Berg T, Erikson U, Nordtvedt TS. 1997. Rigor mortis assessment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and effects of stress. *J Food Sci*. 62(3):439-446.
- Bitó M, Yamada K, Mikumo Y, Amano K. 1983. Differences in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab*. 109:89-93.
- Blessing JJ, Marshall JC, Malcombe SR. 2010. Humane killing of fishes for scientific research: a comparison of two methods. *J Fish Biol*. 76(10): 2571-2577.
- Bonga SW. 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*. The Netherlands: Department of Animal Physiology, University of Nijmegen. 77(3): 591-625.

- Boyd NS, Wilson ND, Jerrett AR, Hall BI. 1984. Effects of brain destruction on post-harvest muscle metabolism in the fish kahawai (*Arripis trutta*). *J Food Sci.* 49(1):177-179.
- Bradford MR. 1995. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain Behav.* 46(4-5):259-274.
- Braithwaite VA, Ebbesson LOE. 2014. Pain and stress responses in farmed fish. *Rev Sci Tech.* 33(1):245-253.
- Broom DM. 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science* 69(10): 4167–4175.
- Buchanan JT. 2001. Contributions of identifiable neurons and neuron classes to lamprey vertebrate neurobiology. *Progress in Neurobiology.* 63(4):441–466.
- Buttkus, H.J. (1963). Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis. *J Fish Res. Board Can.* 20: 45-58.
- Caporale V, Alessandrini B, Dalla Villa P, Del Papa S. 2005. Global perspectives on animal welfare: Europe. *Rev Sci Tech.* 24(2): 567-77.
- Cappeln G, Jessen F. 2002. ATP, IMP, and Glycogen in Cod Muscle at Onset and During Development of Rigor Mortis Depend on the Sampling Location. *J Food Sci.* 67(3):991-995.
- Cárdenas S. 2010. Crianza de la Corvina (*Argyrosomus regius*). Colección cuadernos de acuicultura. Madrid: FOESA, CSIC y MARM. 3: 1-100.
- Castaldo AC. 2012. Influence of nutritional composition of broodstock diet on meager, *Argyrosomus regius*, reproductive performance and egg quality. [Laurea magistrale in Biologia Marina]. Padova: Università Degli Studi di Padova.
- Cech JJ, Bartholow SD, Young PS, Hopkins TE. 1996. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: Physiological responses to recovery environment. *Transactions of the American Fisheries Society.* 125(2):308-320.
- Chandaroo KP, Duncan IJ, Moccia RD. 2004. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl Anim Behav Sci.* 86(3):225-250.
- Chandaroo KP, Yue S, Moccia RD. 2004. An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish and fisheries*, 5(4):281–295.
- Chao LN, 1986. Sciaenidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E, editors. *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. Paris (FR): UNESCO; v.2, p.865-876.
- Chen GR, Sun LT, Lee YH, Chang CH. 1995. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *Journal of Applied Aquaculture*, 5(3): 21 – 31.
- [COM] Comissão Europeia. 2018. Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho - Possibilidade de introduzir certos requisitos no que se refere à proteção dos peixes no momento da occisão (Texto relevante para efeitos do EEE). Bruxelas. [internet]. [accessed Jan 4 2019]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:52018DC0087&from=EN>
- Concollato A, Parisi G, Olsen RE, Kvamme BO, Slinde E, Zotte AD. 2014. Effect of carbon monoxide for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) slaughtering on stress response and fillet shelf life. *Aquaculture.* 433, 13-18.
- Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA. 2005. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. *Lab Animal*, 39(2):137-161.
- Conte FS. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Appl Anim Behav Sci.* 86 (3-4):205-223.
- Cuadrado MI, Coveñas R, Tramu G. 1994. Distribution of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactivity in the rainbow trout brain. *Peptides.* 15(6):1027-1032.
- Curran CA, Poulter RG, Brueton A, Jones NSD. 1986. Effect of handling treatment on fillet yields and quality for tropical fish. *J Food Tech.* 21:301-310.
- Daskalova A. 2019. Farmed fish welfare: stress, post-mortem muscle metabolism, and stress-related meat quality changes. *Int Aquat Res.* 11(2):113-124.
- Davie PS, Kopf RK. 2006. Physiology, behaviour and welfare of fish during recreational fishing and after release. *N Z Vet J.* 54(4):161-172.
- De Kloet ER. 2004. Hormones and the stressed brain. *Annals NY Acad Sci.* 1018:1-15.
- Diggles B, Cooke S, Rose J, Sawynok W. 2011. Ecology and welfare of aquatic animals in wild capture fisheries. *Rev Fish Biol Fish.* 21(4):739-765.
- Diggles B, Landos M. 2012. Literature Review - Best practice in humane dispatch of finfish caught by recreational anglers. DigsFish Services Client Report DF12-01. Prepared for Commonwealth of Australia, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 20 pgs. [accessed Dez 7 2018] <http://www.digsfish.com/AW1011-08Literaturereviewfinal.pdf>.

- Digre H, Erikson U, Misimi E, Lambooij B, van de vis H. 2010. Electrical stunning of farmed Atlantic cod *Gadus morhua* L.: a comparison of an industrial and experimental method. *Aquac Res.* 41(8):1190-1202.
- Digre H, Erikson U, Skaret J, Lea P, Gallart-Jornet L, Misimi E. 2011. Biochemical, physical and sensory quality of ice-stored Atlantic cod (*Gadus morhua*) as affected by pre-slaughter stress, percussion stunning and AQUI-S anaesthesia. *Europ Food Res Tech.* 233:447-456.
- Docapesca (2017). Ficha de produtos, Corvina-legítima. [accessed 2019 Dez 12] [http://www.docapesca.pt/pt/component/docman/doc\\_download/1339-corvina-legitima.html](http://www.docapesca.pt/pt/component/docman/doc_download/1339-corvina-legitima.html).
- Duncan NJ, Estévez A, Fernández-Palacios H, Gairin I, Hernández-Cruz CM, Roo FJ, Schuchardt D, Vallés R, 2013. Aquaculture production of corvina (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 519-541.
- Dunlop R, Laming P. 2005. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Pain.* 6(9):561-8.
- Duran A, Erdemli U, Karakaya M, Yilmaz M. 2008. Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and mirror carp *Cyprinus carpio* filleted in pre-, in- or post-rigor periods. *Fisheries Science* 74(5):1146-1156.
- Ebbesson SOE, Hodde KC. 1981. Ascending spinal systems in the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Cell Tissue Res.* 216(2):313-331.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. *EFSA J.* 45: 1-29.
- [EFSA] European Food Safety Authority (2009a) Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed atlantic salmon. *EFSA J.* 2012:1-77.
- [EFSA] European Food Safety Authority (2009b). Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed seabass and seabream. *EFSA J.* 954:1-27.
- [EFSA] European Food Safety Authority (2009c) Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish: rainbow trout. *EFSA J.* 1013:1-55.
- [EFSA] European Food Safety Authority (2009d). General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *EFSA J.* 1010:1-52.
- Ehira S, Uchiyama H. 1987. Determination of Freshness Using the K Value and Comments on Some Other Biochemical Changes in Relation to Freshness. In: Kramer DE, Liston J, editors. *Seafood Quality Determination*. Amsterdam (NL): Elsevier Science Publishers BV: p.185-207.
- Ehrensing RH, Michell GF, Kastin AJ. 1982. Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in *Carassius auratus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 17(4):757-761.
- Erikson U. 2001. Rigor measurements. In Kestin S, Wariss P, editors. Oxford, UK: Blackwell Science *Farmed fish quality*: pp. 283-297.
- Erikson, U. (2011). Assessment of different stunning methods and recovery of farmed Atlantic salmon: isoeugenol, nitrogen, and three levels of carbon dioxide. *Animal Welfare* 20, 365–37.
- Erikson U, Hultmann L, Steen JE. 2006. Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia: I. Establishing a method for largescale processing of farmed fish. *Aquaculture.* 252(2-4):183-198.
- Erikson U, Sigholt T, Seland A. 1997. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 149:243-252.
- Erikson U, Sigholt T, Rustad T, Einarsdottir IE, Jørgensen L. 1999. Contribution of bleeding to total handling stress during slaughter of Atlantic salmon. *Aquaculture.* 7(2):101-115.
- Esteves E, Aníbal J. 2007. Quality Index Method (QIM): Utilização da Análise Sensorial para determinação da qualidade do pescado. *Actas do 13º Congresso do Algarve, Racal-Clube, Lagos.* p.365-373.
- Erikson U. 2008. Live chilling and carbon dioxide sedation at slaughter of farmed Atlantic salmon: A description of a number of commercial case studies. *J Appl Aquac.* 20: 38–61
- Fagundes M, Urbinati EC. 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture.* 276(1-4):112-119.
- [FAWC] Farm Animal Welfare Council .1996. Report on the welfare of fish. Department for Environment, Food & Rural Affairs. [Accessed Ago 29 2018]. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/325555/FAWC\\_report\\_on\\_the\\_welfare\\_of\\_farmed\\_fish.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/325555/FAWC_report_on_the_welfare_of_farmed_fish.pdf).

- Ferreira H. 2017. Produção integrada de corvinas (*Argyrosomus regius*) e ostras (*Crassostrea gigas*) em tanques de terra. [Dissertação de mestrado em Aquacultura]. Leiria: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria.
- Flik G, Klaren PHM, van den Burg EH, Metz JR, Huising MO. 2006. CRF and stress in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 146:36-44.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. Huss HH. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department [internet] [Accessed Mar 9 2019]. <http://www.fao.org/3/V7180E/V7180E00.HTM#Contents>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*) as an emerging species in Mediterranean aquaculture. Monfort M. Rome: Food and Agriculture of the United Nations, 28. internet] [Accessed Mar 12 2019]. <http://www.fao.org/3/I1675E/I1675e.pdf>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005-2019. Cultured Aquatic Species Information Programme-*Argyrosomus regius*. Stipa P, Angelini M. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department [internet]. [Update 10 February 2005]. [Accessed Mai 8 2019]. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus\\_regius/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en).
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2001. Rigor in Fish - The Effect on Quality. Stroud GD. [Accessed Abr 11 2019] <http://www.fao.org/3/x5914e/x5914e00.htm#Contents>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. Fishery and aquaculture statistics 2017. [Accessed Jun 18 2019] <http://www.fao.org/3/ca5495t/CA5495T.pdf>
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Fishery and aquaculture statistics 2011. [Accessed Jun 18 2019] <http://www.fao.org/3/i3507t/i3507t.pdf>.
- Forgan LG, Jerrett AR, Tuckey NP, Forster ME. 2010. Post-mortem calorimetric and biochemical profiles of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) white muscle following rested and exhausted harvesting. *Thermochim Acta.* 499(1):133-143.
- Gaynor J, Muir W. 2008. Physiology and pathophysiology of pain. In: Gaynor J, Muir W, editors. 2nd ed. Handbook of veterinary pain management. Mosby (NO); p.13-39.
- Giuffrida A, Pennisi L, Ziino G, Fortino L, Valvo G, Marino S, Panebianco A. 2007. Influence of slaughtering method on some aspects of quality of gilthead seabream and smoked rainbow trout. *Vet Res Commun.* 31(4):437-446.
- Godiksen H, Morzel M, Hyldig G, Jessen F. 2009. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem.* 113(4):889-896.
- González-Quirós, R, del Árbol J, García-Pacheco MM, Silva-García, A., J., Naranjo, J., M., Morales-Nin, B. (2011) Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*, 109,140-149.
- Gregory NG, Wotton SB. (1983). Studies on the central nervous system: Visually evoked cortical responses in sheep. *Research in Veterinary Science*, 34(3), 315-319.
- Haffray P, Malha R, Sidi MOT, Prista N, Hassan M, Castelnaud G, Karahan-Nomm B, Gamsiz K, Sadek S, Bruant JS, Balma P, Bonhomme F. 2012. Very high genetic fragmentation in a large marine fish, the corvina *Argyrosomus regius* (Sciaenidae, Perciformes): impact of reproductive migration, oceanographic barriers and ecological factors. *Aquatic Living Res.* 25:173-183
- Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, Imada C, Watanabe E. 2005. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control.* 16(4):301-307.
- Håstein T, Scarfe, AD, Lund VL. 2005. Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Rev Sci Tech: Office International des Epizooties.* 24(2)
- [HSA] Humane Slaughter Association. 2014. Humane Harvesting of Fish. UK: The Old School, Brewhouse Hill, Wheathampstead, Herts [internet]. [Accessed Nov 8 2018]. <https://www.hsa.org.uk/downloads/publications/harvestingfishdownload.pdf>.
- Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF. 2006. Current issues in fish welfare. *J Fish Biol.* 68(2):332-372.
- Ikigun. 2019. Iki jime for better tasting fish. New Zeland:DigsFish Services Pty Ltd. [accessed 2019 Apr 20]. <https://www.ikigun.com/>.
- [IPMA] Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2019. Corvina (*Argyrosomus regius*). Lisboa: IMPA [internet]. [Accessed Fev 5 2019] <https://www.ipma.pt/pt/pescas/eppo/corvina/index.jsp>.



- [IPMA] Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2019. Corvina legítima – *Argyrosomus regius*. Lisboa: IPMA [internet]. [Accessed Fev 5 2019] [https://www.ipma.pt/resources/www/docs/publicacoes.site/pescado/site/corvina/corv\\_all.htm](https://www.ipma.pt/resources/www/docs/publicacoes.site/pescado/site/corvina/corv_all.htm)
- Ito H, Murakami T, Fukuoka T, Kishida R. 1986. Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual somatosensory, octavolateral, and cerebellar relay region to the telencephalon. *J Comp Neurol*. 250(2):215-227.
- Iwama G, Afonso L, Todgham A, Ackerman P, Nakano K. 2004. Are Hsps suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol*. 207:15-19.
- Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Scherck CB. 1997. Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. UK: Cambridge University.
- Iwamoto M, Yamanaka H, Watabe S, Hashimoto K. 1987. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. *J Food Sci*. 52(6):1514-1517.
- Jerrett AR, Holland AJ. 1998. Rigor tension development in excised “rested”, “partially exercised” and “exhausted” Chinook salmon white muscle. *J Food Sci*. 63(1):48-52.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev*. 16(2):115-130.
- Kestin SC, Robb DHF, Wotton SB, Warriss PD. 1997. The effect of two methods of electrical stunning on carcass haemorrhages in trout. Proceedings of the European Aquaculture Society Meeting, 10-12 Ago. Oostende, Belgium: European Aquaculture Society. Special publication, 46-47.
- Kestin SC, van de Vis JW, Robb DHF. 2002. A simple protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of stunning and killing methods used on fish. *Vet Record*. 150(10):302-307.
- Kestin SC, Wotton S, Adams S. 1995. The effect of CO<sub>2</sub>, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare, in *Quality in Aquaculture*. Gent, Belgium: European Aquaculture Society. Special Publication. 23:380-381.
- Kestin SC, Wotton SB, Gregory NG. 1991. Effect of slaughter by removal from water on visual evoked activity in the brain and reflex movement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Rec*. 128(19):443-446.
- Kevetter GA, Willis WD. 1984. Collateralization in the Spinothalamic tract: New methodology to support or deny phylogenetic theories. *Brain Res*. 319(1):1-14.
- Kiessling A, Espe M, Ruohonen K, Mørkøre T. 2004. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO<sub>2</sub> anaesthesia. *Aquaculture*. 236(1-4):645-657.
- Knowles TG, Brown SN, Warriss PD, Lines J, Tinarwo A, Sendon M. 2008. Effect of electrical stunning at slaughter on the quality of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Aquac Res*. 39(16):1731-1738.
- Kooi KA, Tucker RP, Marshal RR. 1978. Fundamentals of Electro Encephalography. 2nd ed. New York: Harper and Row; pp 125-145.
- Lagardère JP, Mariani A. 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *J Fish Biol*. 69(6):1697-1708.
- Lambooi E, Kloosterboer RJ, Gerritzen MA, van de Vis JW. 2006. Assessment of electrical stunning in freshwater of African catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility. *Aquaculture*. 254(1-4):388-395.
- Lambooi E, Gerritzen MA, Reimert H, Burggraaf D, Van de Vis JW. 2008. A humane protocol for electro-stunning and killing of Nile tilapia in fresh water. *Aquaculture*. 275: 88-95.
- Lambooi E, van de Vis, JW, Kloosterboer RJ, Pieterse C. 2002. Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): neurological and behavioural assessment. *Aquaculture*. 210(1):159-169.
- Lambooi E, Vis J, van de Kloosterboer RJ, Pieterse C, Gerritzen MA. 2003. Stunning of farmed African Catfish (*Clarias gariepinus*) by using captive needle pistol: assessment of welfare aspects. *Aquac Res*. 34:1353-1358.
- Lamont L, Tranquilli W, Grimm K. 2000. Physiology of pain. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract*. 30(4):703-728.
- Lemke K. 2004. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *Can Vet J*. 45(5):405-13.
- Lima LC, Ribeiro LP, Malison JA, Barry TP, Held JA. 2006. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma* sp. *J World Aquac Soc*. 37(1):89-95.
- Lines JA, Spence J. 2014. Humane harvesting and slaughter of farmed fish. *Rev Sci Tech*. 33(1):255-264.
- Lines JA, Kestin, SC. 2005. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. *Aquac Eng*. 32(3):483-491.

- Lines JA, Robb DH, Kestin SC, Crook SC, Benson T. 2003. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquac Eng.* 28(3-4):141-154.
- Lopez da Silva HF. 1983. The assessment of consciousness: general principles and practical aspects. In: Eikelenboom G, editor. *Stunning of Animals for Slaughter*. The Hague (NL): Martinus Nijhoff; p.3-12.
- Lowe T, Ryder JM, Carrager JF, Wells RM. 1993. Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *J Food Sci.* 58(4):770-773.
- Martin AR, Wickelgren WO. 1971. Sensory cells in the spinal cord of the sea lamprey. *J Physiol.* 212(1):65-83.
- Marx H, Brunner B, Weinzierl W. 1997. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung.* 204:282-286.
- Matos E, Gonçalves A, Nunes ML, Dinis MT, Dias J. 2010. Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* 305(1-4): 66-72.
- Matthews G, Wickelgren WO. 1978. Trigeminal sensory neurons of the sea lamprey. *J Comp Physiol.* 123(4):329-333.
- Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *J Trans Am Fish Soc.* 106:201-212.
- McDonald Milligan L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB, editors. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University. p119-144
- Medina L, Abellan A. 2009. Development and evolution of the pallium. *Literature Review in Seminars in Cell and Developmental Biology.* 20(6), 698-711.
- Morzel M, van de Vis H. 2003. Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.). *Aquac Res.* 34(1):1-11.
- Morzel M, Sohler D, van de Vis JW. 2002. Evaluation slaughtering methods of turbot with respect to animal protection and flesh quality. *J Sci Food and Agric.* 83(1):19-28.
- Mueller T, Wullimann MF. 2009. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain Behav Evol.* 74(1):30-42.
- Mueller T, Dong Z, Berberoglu MA, Guo S. 2011. The dorsal pallium in Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Res.* 1381:95-105.
- Mugnier C, Fostier A, Guezou S, Gaignon JL, Quemeneur L. 1998. Effect of some repetitive factors on turbot stress response. *Aquac Int.* 6: 33-45.
- Nakayama T, Toyoda D, Ooi A. 1994. Physical property of carp muscle during rigor tension generation. *Fish Sci.* 60(6):717-721.
- Newby N, Stevens D. 2008. The effects of the acetic acid "pain" test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *App Anim Behav Sci.* 116(1):97-99.
- Nordgreen J, Garner JP, Janczak AM, Ranheim B, Muir WM, Horsberg TE. 2009. Thermo nociception in fish: Effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Appl Anim Behav Sci.* 119(1-2):101-107.
- Northcutt RG. 2006. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *J Comp Neurol.* 494(6): 903-43.
- Northcutt RG. 2008. Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Res Bull.* 75(2-4):191-205.
- Nunes ML, Batista I. (2004). Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Folheto informativo nº 29*. Lisboa: IPIMAR. [internet]. [Accessed Feb 12 2019]. [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/288929/mod\\_resource/content/1/Pescado-fresco-Folheto29.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/288929/mod_resource/content/1/Pescado-fresco-Folheto29.pdf)
- Nunes ML, Batista I, Cardoso C. 2007. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Publicações Avulsas do IPIMAR.* 15. 1-51.
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2012. Welfare aspects of stunning and killing of farmed fish for human consumption. *Aquatic animal health code*, chapter 7. [internet]. [Accessed Mar 22 2019].
- Ottera H, Roth B, Torrissen OJ. 2001. Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: Kestin SC, Warriss PD, editors. *Farmed Fish Quality*. Oxford (UK): Blackwell Science Ltd; p.398-399.
- Padmavathy P, Ramanathan N. 2010. Quantitative changes of glycogen and lactate in muscle, blood and liver tissues of *Oreochromis mossambicus* under hypoxia and recovery. *Sci N Y.* 6(2):54-59.

- Paeile C. 2005. Algunas consideraciones de las vías aferentes y eferentes del estímulo nervioso. In: Paeile JC, Bilbeny NL, editors. 3rd ed. El dolor: de lo molecular a lo clínico. Santiago: Editorial Mediterráneo.
- Pate EF, Brokaw CJ. 1980. Cross-bridge behaviour in rigor muscle. *Biophysics of Structure and Mechanism*. *Europ Bioph J*. 7(1):51-63.
- Paul-Murphy J. 2007. Pain Management In: Harrison GJ, Lightfoot TL, editors. *Clinical Avian Medicine*. Ithaca, New York USA: International Veterinary Information Service.
- Pedrazzani AS, Molento CFM, Carneiro PCF, Fernandes de Castilho M. 2007. Fish welfare and the problem of sentience. *Arch Vet Sci*. 11(3):60-70.
- Peixoto MJ, Salas-Leitón E, Brito F, Pereira LF, Svendsen JC, Baptista T, e de Almeida, Ozório RO. 2017. Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *J App Phycol*. 29(1):433-447
- Perl ER. 2007. Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci*. 8(1):71-80
- Pickering AD. 1981. Stress and fish. Pickering, AD, editor. London/New York: Academic press; pp 367
- Poli BM. 2009. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Ital J Anim Sci*. 8:139-160.
- Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G. 2005. Fish welfare and quality as affected by preslaughter and slaughter management. *Aquac Int*. 13:29-49.
- Portavella M, Salas CM, Vargas JP, Papini MR. 2003. Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Behav*, 80(1):49-56.
- Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. 2002. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull*. 57(3-4):397-399.
- Porteros A, García-Isidoro M, Barrallo A, González-Sarmiento R, Rodríguez RE. 1999. Expression of ZFOR1, opioid receptor, in the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 412(3):429-438.
- Prista N, Costa JL, Costa MJ, Jones C. 2009. Age determination in meagre *Argyrosomus regius*. *Relatórios Científicos e Técnicos do Lisboa*, nº49, 54 pp. Lisboa:IPIMAR. [internet]. [Accessed Dez 11 2018]. <https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/docweb/2009/Reln49final.pdf>
- Rahmanifarah K, Shabanpour B, Sattari A. 2011. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in comparison with pre-slaughter CO<sub>2</sub> stunning, chilling and asphyxia. *Turk J Fish Aquat Sci*. 11(1):139-147.
- Reedy MK, Holmes KC, Tregear RT.(1965), Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature*. 207(5003):1276-1280.
- Regulamento (CE) N.º 1099/2009 do Conselho de 24 de Setembro de 2009 relativo à protecção dos animais no momento da occisão. *Jornal Oficial da União Europeia*. [internet]. [Accessed Jan 12 2019]. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:303:0001:0030:PT:PDF>
- Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU. 2008. Novel candidate genes identified in the brain during nociception in common carp. *Neurosci Lett*. 437(2):135-138.
- Ribas L, Flos R, Reig L, MacKenzie S, Barton BA, Tort L. 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture*. 269(1-4):250-258.
- Rink E, Wullimann MF. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res*. 889(1-2):316-30.
- Robb DHF, Kestin SC. 2002. Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Animal Welfare*, 11(3): 269-282.
- Robb DHF, Roth B. 2003. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. *Aquaculture*. 216(1-4):363-369.
- Robb DHF. 2008. Welfare of fish at harvest. In: Branson EJ, editor. *Fish welfare*. London: Blackwell; 217-242.
- Robb DHF, Kestin SC, Warriss PD. 2000a. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture*. 182:261-269.
- Robb DHF, Wotton SB, McKinsty JL, Sørensen NK, Kestin SC. 2000b. Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *Vet Rec*. 147(11):298-303.
- Ronan M, Northcutt RG. 1990. Projections ascending from the spinal cord to the brain in petromyzontid and myxinoidean agnathans. *J Comp Neurol*. 291(4):491-508.

- Roques JA, Abbink W, Geurds F, van de Vis H, Flik G. 2010. Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiol Behav.* 101(4):533-40.
- Rose JD. 2002. The neurobiological nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev Fish Sci.* 10(1):1-38
- Rose JD, Arlinghaus R, Cooke SJ, Diggles BK, Sawynok W, Stevens ED, Wynne CDL. 2014. Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries.* 15(1):97-133
- Roth B, Birkeland S, Oyarzun F. 2009. Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. *Aquaculture.* 289(3):350-356
- Roth B, Moeller D, Slinde E. 2004. Ability of electric field strength, frequency and current duration to stun farmed Atlantic salmon and pollock and relations to observed injuries using sinusoidal and square wave alternating current. *J Aquac.* 66(3):208-216.
- Roth B, Moeller D, Veland JO, Imsland A, Slinde E. 2002. The Effect of Stunning Methods on Rigor Mortis and Texture Properties of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Food Sci.* 67(4):1462-1466
- Roth B, Slinde E, Robb DHF. 2006. Field evaluation of live chilling with CO<sub>2</sub> on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquac Res.* 37(8):799-804.
- Rotllant J, Balm PHM, Perez-Sanchez J, Bonga WSE, Tort L. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen Comp Endocrinol.* 121(3):333-342.
- Rovainen CM, Yan Q. 1985. Sensory responses of dorsal cells in the lamprey brain. *J Comp Physiol.* 156:181-183.
- [RSPCA] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. 2004. Killing Me Softly in Welfare underwater: issues with aquatic animals Jones B, editor. Proceedings of the 2004 RSPCA Australia Scientific Seminar held at the Telstra Theatre, Australian War Memorial, Canberra, [internet]. [Accessed Jan 12 2019]. <https://www.rspca.org.au/sites/default/files/website/The-facts/Science/Scientific-Seminar/2004/SciSem2004-Proceedings.pdf>
- Sainclivier M. 1983. L'industrie alimentaire halieutique. École Nationale Supérieure Agronomique et Centre de Reserches de Rennes. *Bull Sci Tech.* 1:263.
- Sebastio P, Ambroggi F, Baldrati G. 1996. Influence of slaughtering method on rainbow trout bred in captivity. 1. Biochemical considerations. *Ind. Conserve.* 71:37-49.
- Segner H. 2012. Fish. Nociception and pain: A biological perspective. Contributions to ethics and biotechnology. Bern (CH): FOBL; p.31-38.
- Sigholt T, Erikson U, Rustad T, Johansen S, Nordtvedt T, Seland A. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Food Sci.* 62(4):898-905
- Skjervold PO, Fjæra SO, Snipen L. 2002. Predicting live-chilling dynamics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 209(1-4):185-195.
- Skjervold PO, Rørå AM, Fjæra SA, Vegusdal A, Vorre A, Einen O. 2001. Effects of pre-, in-, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture.* 191(3-4):315-326.
- Sneddon LU. 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci.* 83(2):153-162.
- Sneddon LU. 2004. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Rev.* 46(2):123-130.
- Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ. 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc Biol Sci.* 270(1520):1115-1121.
- Southgate P, Wall T. 2001. Welfare of farmed fish at slaughter. *In practice.* 23(5):277-284.
- Stevens ED, Sutterlin AM. 1979. Heat transfer between fish and ambient water. *J Exp Biol.* 65(1):131-145.
- Stien L, Hirmas E, Bjornevik M, Karlsen O, Nortvedt R, Rora AMB, Sunde J, Kiessling A. 2005. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac Res.* 36(12):1197-1206.
- Striedter GF. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol.* 49(4):179-213.
- Striedter GF. 2005. Principles of Brain Evolution. *J Evol Bioch Physiol.* 46(4):422-427.
- Teixeira MS, Borges A, Franco RM, Clemente SC, Freitas MQ. 2009. Método de índice de qualidade (QIM): desenvolvimento de um protocolo sensorial para corvina (*Micropogonias furnieri*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.* 16(2):83-88.
- Thomas P. 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring, *Am. Fisheries Soc. Symp.* 8: 9–28.
- Tobiassen T, Akse L, Midling K, Aas K, Dahl R, Eilertsen G. 2006. The effect of pre-rigor processing of cod (*Gadus morhua* L.) on quality and shelf life. In: Luten JB, Jacobsen C, Bekaert K, Sæbø A,

- Oehlenschläger J, editors. Seafood research from fish to dish. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; p.149–159
- Tort L, Padros F, Rotllant J, Crespo S. 1998. Winter syndrome in the gill head sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological feature. *Fish Shellfish Immunology*, 8, 37-47.
- Ullström M, Parker D, Svensson E, Grillner S. 1999. Neuropeptide-mediated facilitation and inhibition of sensory inputs and spinal cord reflexes in the lamprey. *J Neurophysiol.* 81(4):1730-1740.
- Van de Vis H, Kestin S, Robb D, Oehlenschläger J, Lambooy B., Munkner W., ... Nesvadba P. 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquac Res.* 34(3):211-220.
- Van de Vis JW, Oehlenschläger J, Kuhlmann H, Miinkner W, Robb DH, Schelvis-Smit AA. 2001. Effect of the commercial and experimental slaughter of eels (*Anguilla anguilla*) on quality and welfare. In: Kestin SC, Warriss PD, editors. *Farmed Fish Quality*. Bristol (GB): Fishing News Books; p.234-248.
- Volpato GL. 2009. Challenges in Assessing Fish Welfare. *ILAR J*, 50(4): 329–337.
- Wall AJ. 2001. Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In *Farmed fish quality* (Kestin SC, Warriss PD, editors. Fishing News Books. Oxford: Blackwell Science; p108-115.
- Weber S. 2011. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion or nociception? *Vet. Clin. Exot. Anim.* 14:21-32.
- Webster AJF. 2001. Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *Vet J.* 161(3): 229-237.
- Wicht H, Northcutt RG. 1998. Telencephalic connections in the pacific hagfish (*Eptatretus stouti*), with special reference to the thalamopallial system. *J Comp Neurol.* 395(2):245-260.
- Wilkinson RJ, Paton N, Porter MJ. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture.* 282(1):26-32.
- Wills CC, Zampacavallo G, Poli BM, Proctor MRM, Hennehan GTM. 2006. Nitrogen stunning of rainbow trout. *Int J Food Sci Tech.* 41(4):395-398.
- Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. 2009. Evaluation of Rapid Cooling and Tricaine Methanesulfonate (MS222) as Methods of Euthanasia in Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 48(6):785-789.
- Woodward CC, Strange RJ. 1987. Physiological stress responses in wild and hatchery-reared rainbow trout. *Trans Am Fish Soc.* 116:574 -579.  
[https://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre\\_welfare\\_stunning\\_killing.htm](https://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_welfare_stunning_killing.htm)
- Wullimann MF, Mueller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol.* 475(2):143-62.
- Zhang L, Li Q, Lyu J, Kong C, Song S, Luo Y. 2017. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4 °C during 72 h postmortem. *Food Chem.* 216:130-137.
- Zieglgansberger W. 1986. Central control of nociception. Mountcastle VB, Bloom FE, Geiger SG, editors. *Handbook of physiology-the nervous system IV*. Baltimore: Williams & Wilkins Comp; v.4 .p581-645.
- Zupanc GKH. 1997. The preglomerular nucleus of gymnotiform fish: relay station for conveying information between telencephalon and diencephalon. *Brain Res.* 761(2):179-191.

## Anexos

**Anexo 1 - Tabela adaptada do Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho: Legislação e orientações nacionais ou códigos de práticas que regulam aspetos de bem-estar relativos ao abate de peixes de viveiro (COM, 2018).**

	<b>Legislação</b>	<b>Orientações nacionais/normas</b>
<b>Noruega</b>	-O Regulamento (CE) n.º 1099/2009 -Regulamento norueguês n.º 1250/2006	-Documento relativo aos requisitos para o bem-estar dos animais da aquacultura durante o abate (NFSA).
<b>Reino Unido</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009; -"Animal Welfare Act", 2006; -"Welfare of Animals at the Time of Killing Regulations", (Escócia) 2012 -"Statutory Instrument" n.º 321 de 2012; -"Welfare of Animals Order", 2006	-Parecer sobre o bem-estar dos peixes de viveiro; -Comité para o bem-estar dos animais de criação; 2014; -Códigos de boas práticas
<b>Irlanda</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009 -"Animal Health and Welfare Bill" 2012	-"Fish Health Code of Practice for Salmonid Aquaculture in Ireland" (2014); -"The Farmed Salmonid Health Handbook" (2011)
<b>Polónia</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009; -Lei de Proteção dos Animais (n.º 111, ponto 724; de 1998, n.º 106, ponto 668)	-Código de Boas Práticas (Kodeks Dobrej Praktyki); 2014
<b>República Checa</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009 -Lei n.º 246/1992 Col. e seguintes alterações sobre a proteção dos animais - Decreto n.º 245/1996 Col. e decreto n.º 382/2004 Col sobre métodos de abate	- Diretriz n.º 5/2015 relativa aos peixes à venda na praça/loais de venda
<b>Alemanha</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009 -Lei de proteção dos animais no abate (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (TierschutzSchlachtverordnung TierSchlV)	- Boas práticas de higiene (1994) - Boas práticas de criação de peixes de tanque (carpas) (gute fachliche Praxis der Teichwirtschaft in Brandenburg)
<b>França</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009 -Nota de serviço 20078016 da DGAL de 16 de janeiro de 2007	Nenhuma
<b>Itália, Dinamarca Portugal</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009	Nenhuma
<b>Grécia</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009	-2 circulares sobre o bem estar dos peixes de viveiro (23/3/2015; 9/6/2015)
<b>Espanha</b>	-Regulamento (CE) n.º 1099/2009	-Piscicultura; Guia de práticas corretas para a occisão (Piscicultura; -Guia de practica correctas para el sacrificio; 2016; AEONOR)

**Anexo 2 - Esquema QIM adaptado para a avaliação sensorial do grau de frescura de corvina, *Argyrosomus regius* (Adaptado de Teixeira et al. 2009; Nunes et al. 2007).**

Parâmetros		Descritores		Pontos de demérito
Aspeto geral	Pele	Brilhante	0	
		Menos brilhante	1	
		Ligeiramente descorada	2	
		Muito descorada	3	
	Coloração do abdómen	Branca prateada	0	
		Esbranquiçada ou ligeiramente amarelada	1	
		Amarelada	2	
	Firmeza da carne	Muito rígida e firme	0	
		Ligeiramente mole	1	
		Mole	2	
Olhos	Córnea	Límpida, translúcida	0	
		Ligeiramente turva	1	
		Turva, amarelada	2	
	Pupila	Preta azulada viva	0	
		Preta enevoadada	1	
		Cinzenta, leitosa	2	
	Forma	Convexa	0	
		Achatada, plana	1	
		Côncava	2	
Brânquias	Cor	Vermelho vivo a púrpura	0	
		Menos viva, pálida nos bordos	1	
		Descoradas	2	
	Odor	Algas, fresco	0	
		Neutro, a algas menos intenso	1	
		Ligeiramente acre ou rançoso	2	
Índice de qualidade (total de pontos de demérito)			0-17	

### Anexo 3 – Questionário: Avaliação da percepção do consumidor sobre o abate de peixes

#### Perfil do consumidor - Consumo de pescado

Indique, em termos médios, a frequência com que consome pescado:

Nunca	Apenas 1-3 vezes por mês	1-3 vezes por semana	3-5 vezes por semana	Mais de 5 vezes por semana
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Indique a origem do pescado que costuma consumir:

Aquacultura	Selvagem	Ambos	Não sei
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Selecione o fator que influencia mais a decisão de compra de:

	Preço	Valor nutricional	Bem-estar animal	Nível de controlo	Paladar	Não consumo	Outra
Peixe selvagem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe de aquacultura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### Caracterização sociodemográfica

Género:

☐ Feminino

☐ Masculino

Idade:

☐ Menos de 25

☐ 25-45

☐ 46-65

☐ Mais de 65

Local de residência do inquirido - Concelho



**Habilitações literárias:**

☐ Ensino Básico

☐ Ensino Secundário

☐ Licenciatura

☐ Mestrado

☐ Doutoramento

**Selecione a sua área profissional**

Por favor escolha...

**Perceção do consumidor face ao abate de peixes**

**Na sua opinião, os peixes são seres dotados de sensibilidade?**

☐ Sim

☐ Não

☐ Não sei

**Indique, na sua opinião, o fator a ter em consideração no abate de peixes:**

Bem-estar animal

☐

Qualidade da Carne

☐

Ambos

☐

É indiferente

☐

**Na sua opinião, a etapa do abate influencia a qualidade do pescado?**

☐ Sim

☐ Não

☐ Não sei

**Indique os métodos de abate de peixes que conhece:**

Percussão  
craniana

☐

Secção medular

☐

Iji jime

☐

Asfixia (ar)

☐

Narcose  
CO<sub>2</sub>/CO

☐

Choque térmico

☐

Choque elétrico

☐

Nenhum

☐

**Indique, na sua opinião, o método de abate de peixes que induz:**

Percussão  
craniana

☐

Secção  
medular

☐

Iji jime

☐

Asfixia (ar)

☐

Narcose  
CO<sub>2</sub>/CO

☐

Choque  
térmico

☐

Choque  
elétrico

☐

Não sei

☐

Mais stress

Menos stress

☐

☐

☐

☐

☐

☐

☐

☐

**No momento de compra, o método de abate a que o animal foi sujeito pode influenciar a sua decisão?**

☐ Sim

☐ Não

☐ Não sei